

522,106

10/522106

(12) NACH DEM VERTRAG VON 20. MÄRZ 1970 FÜR DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/009820 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82, 15/24, A01H 5/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007589

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2003 (14.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 33 327.0 22. Juli 2002 (22.07.2002) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE]; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstr. 7, 35457 Lollar (DE). HÜCK-ELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE). TRUJILLO, Marco [DE/DE]; Heegstraße Weg 10, 35394 Giessen (DE).

(74) Anwalt: PREßLER, Uwe; ., 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/009820 A1

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING THE PATHOGENIC RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining or increasing the pathogenic resistance in plants by reducing the expression, activity or the functioning of a NADPH oxidase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

10 Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten
15 in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz gegen
20 Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.

25 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen verleihen. Die systemische erworbene Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) – ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen – kann durch Applikation von endogenen Botenstoffen
30 wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknas et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester
35 (BTH; Bion®) bewirkt werden (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82). Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
40 In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogen-abwehr beschrieben. Der Verlust des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschgges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH
45 (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjaer MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Durch klassische Züchtung erhaltene Mlo-defiziente Gerstensorten werden bereits in der Landwirtschaft

verwendet. Vermutlich aufgrund der Rezessivität hat sich trotz eines intensiven Anbaus die Resistenz als dauerhaft erwiesen. Mlo-ähnliche Resistenzen in anderen Pflanzen v.a. in Getreidearten sind nicht beschrieben. Das Mlo-Gen und verschiedene Homologe aus anderen Getreidearten wurde identifiziert und kloniert (Büschgges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; 10 WO 99/47552). Nachteilig ist, dass der Mlo-vermittelte Abwehrmechanismus ein spontanes Absterben von Blattzellen umfasst (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Nachteilig ist ferner, dass die Mlo-defizienten Genotypen eine Hypersuszeptibilität gegen hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* 15 (*M. grisea*) sowie *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) zeigen (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; z.B. Superoxid 20 (O_2^-), Hydroxylradikale und H_2O_2) wird eine wichtige protektive Funktion in der Reaktion auf pflanzliche Pathogene zugeordnet (Wojtaszek P (1997) Biochem J 322:681-692). Es sind verschiedene Wege bekannt, wie eine Zelle ROS zu produzieren vermag. In den Makrophagen von Säugetieren ist hier insbesondere die NADPH 25 Oxidase zu nennen, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen vermag. Homologe Enzyme wurden auch in Pflanzen identifiziert (Lamb & Dixon (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:251).

30 Es wurde gezeigt, dass Mutationen in der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase in *Arabidopsis thaliana* eine verminderte Akkumulation reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) zeigen. In Bezug auf die Hypersensitive Reaktion (HR) war das Bild uneinheitlich: Bei einer Doppelmutante wurde bei Infektion mit dem 35 avirulenten *Pseudomonas syringae* Bakterium eine verminderte HR gefunden, während mit dem virulenten Oomyceten *Peronospora parasitica* eine erhöhte HR detektiert wurde. Das Wachstum – sowohl von virulenten als auch von avirulenten *P.syringae* Stämmen – war jedoch – im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen – nicht verändert 40 (Torres MA et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:517-522). Ebenso hatte die Inhibition der NADPH-Oxidase mittels des Inhibitors Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) – bei Einsatz physiologisch relevanter Konzentrationen – keinen Effekt auf die Entwicklung pathogener Pilze (Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant 45 Microbe Interact 11:292-300). Ein cDNA Fragment einer Phagozyten NADPH-Oxidase aus Gerste (*pNAox*, Homolog der großen Untereinheit

gp91phox einer Phagozyten NADPHoxidase) ist unter der GenBank Acc.-No.: AJ251717) beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrum von Pathogenen in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

10

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

15

a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle derselben und

20

b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

Überraschenderweise zeigt die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase aus Gerste (pNAox) in der epidermalen Zelle durch einen sequenzspezifischen RNA-Interferenz Ansatz unter Verwendung doppelsträngiger pNAox-dsRNA ("Gene-Silencing") einen signifikant reduzierten Befall infolge einer *Bgh*-Infektion (gemessen anhand der Haustorium-Ausbildung). Dieser Befund ist insbesondere deshalb überraschend, da der mit der NADPH-Oxidase in Verbindung gebrachten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ("oxidative burst") im allgemeinen eine protektive Funktion zugemessen wird.

Ähnlich wie Mlo vermittelt die Verminderung der NADPH-Oxidase Expression eine breite Resistenz gegen verschiedene Isolate von *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. In transienten "Gene-Silencing"-Experimenten wird dabei die Penetrationseffizienz (Haustorien-Bildung) von *Bgh* signifikant um mehr als 35 % reduziert - ein Effekt, der in seiner Stärke dem mittels Mlo-dsRNA erreichten entspricht (Schweizer P et al. (2000) Plant J 24:895-903). In der Wildtyp Gerstensorte Pallas führen ca. 40 % der Pilzpenetrations zu einer Haustorien-Bildung, wohingegen die Penetrationsrate bei einer Verminderung der NADPH-Oxidase Expression mittels Einbringen einer doppelsträngigen RNA der NADPH-Oxidase (pNAox-dsRNA) nur ca. 25 % beträgt. Die Tatsache, dass auch in pathogenempfindlichen Wildtyp-Sorten wie Pallas nur eine Penetration von ca. 40 bis 50 % beobachtet werden kann, ist auf die stets

vorhandene Basalresistenz zurückzuführen. Die NADPH-Oxidase ist aufgrund der dieser Befunde als Schlüsselement für das erfolgreiche Eindringen eines Pathogens wie Bgh in die pflanzliche Zelle zu verstehen. Darüberhinaus ist das Verfahren allen 5 Verfahren überlegen, bei denen ein pathogen-resistenter Phänotyp durch Überexpression eines resistenzvermittelnden Proteins realisiert wird. Das Ausschalten eines Gens, lässt sich ohne Expression eines (Fremd)-Proteins realisieren. Im Idealfall wird lediglich das endogene Gen deaktiviert. Dies hat nicht zu ver- 10 nachlässige Vorteile bei der Zulassung und der Akzeptanz durch den Verbraucher, der Pflanzen mit Fremdproteinen oft mit Vorbe- halt begegnet. Ganz besonders vorteilhaft ist in diesem Zusammen- hang die Verwendung von induzierbaren Promotoren zur Verminderung der NADPH-Oxidasemenge, Aktivität oder Funktion, was beispiels- 15 weise bei Verwendung von pathogeninduzierbaren Promotoren eine Expression nur im Bedarfsfall (d.h. Pathogenbefall) ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. Bevorzugt auf solche, in denen natür- 20 licherweise eine NADPH-Oxidase oder ein funktionelles Äquivalent derselben exprimiert wird.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. 25 Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saat- gut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Ver- mehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder 30 strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungs- stadium. "Pflanze" umfasst alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispiel- 35 haft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, 40 Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus 45 ein.

Der Begriff "Pflanze" umfasst bevorzugt monokotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

5

Ferner umfasst der Begriff dikotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Brassicaceae wie Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten oder Canola, Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss
- Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika, Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,
- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini,
sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Flachs, Roter Pfeffer,
Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke,
Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch,
Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und
den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuss- und Weinarten. Baumarten umfasst bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine,
Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

Ferner umfasst sind Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen wie beispielhaft aber nicht einschränkend die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyle Gattungen und Arten, wie die beschriebenen Getreidearten.

Ganz besonders bevorzugt wird das Verfahren auf monokotyle Pflanzen, am meisten bevorzugt auf Pflanzen mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais,

Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr angewendet.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von

5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel

10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten

15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßigen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine

20 erhöhte Resistenz gegen ein und mehr Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome – neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen – auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder

25 pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %

30 vermindert.

"Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen – im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze – die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren,

35 die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung

40 zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden.

45 Besonders bevorzugt sind Pilze wie beispielsweise der Mehltau. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase, ihrer Aktivität oder Funktion auch eine Resistenz

gegen weitere Pathogene bewirkt. Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene:

5

Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoramycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti).

10 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

15

Erkrankung	Pathogen
Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis / Blumeria graminis</i>
Spelzenbräune	<i>Septoria nodorum</i>
Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
Ährenfusariosen	<i>Fusarium spp.</i>
Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
Flugbrand	<i>Ustilago spp.</i>
Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
Anthrocnoise leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (telomorph: <i>Glomerella graminicola Politis</i>); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum Went</i>)
Anthracnose stalk rot	
Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani Kuhn = Rhizoctonia microsclerotia J. Mattz</i> (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
Black bundle disease	<i>Acremonium strictum W. Gams = Cephalosporium acremonium Auct. non Corda</i>
Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae = Botryodiplodia theobromae</i>
Borde blanco	<i>Marasmiellus sp.</i>
Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum = Cephalosporium acremonium</i>
Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>

	Erkrankung	Pathogen
	Corticium ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
5	Curvularia leaf spot	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallens</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus pallens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
10	Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
15	Diplodia ear rot and stalk rot	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
20	Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodialeaf macrospora</i>

Tabelle 2: Falscher Mehltau

	Erkrankung	Pathogen
25	Brown stripe downy mildew	<i>Sclerotinia rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
	Crazy top downy mildew	<i>Sclerotinia macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>
30	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
	Java downy mildew	<i>Peronosclerospora maydis</i> = <i>Sclerospora maydis</i>
35	Philippine downy mildew	<i>Peronosclerospora philippinensis</i> = <i>Sclerospora philippinensis</i>
	Sorghum downy mildew	<i>Peronosclerospora sorghi</i> = <i>Sclerospora sorghi</i>
40	Spontaneum downy mildew	<i>Peronosclerospora spontanea</i> = <i>Sclerospora spontanea</i>
	Sugarcane downy mildew	<i>Peronosclerospora sacchari</i> = <i>Sclerospora sacchari</i>
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i>)

	Erkrankung	Pathogen
5	Ear rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botryotis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i>), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
10		
15	Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
	Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
	Fusarium ear and stalk rot	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
20	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
	Fusarium stalk rot, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)
25	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	<i>Gibberella zaeae</i> (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
	Gray ear rot	<i>Botryosphaeria zaeae</i> = <i>Physalospora zaeae</i> (anamorph: <i>Macrophoma zaeae</i>)
30	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. zaeae-maydis</i>
	Helminthosporium root rot	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
35	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
	Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
	Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

Erkrankung	Pathogen	
5 Leaf spots, minor	Alternaria alternata, Ascochyta maydis, A. tritici, A. zeicola, Bipolaris victoriae = Helminthosporium victoriae (teleomorph: Cochliobolus victoriae), C. sativus (anamorph: Bipolaris sorokiniana = H. sorokinianum = H. sativum), Epicoccum nigrum, Exserohilum prolatum = Drechslera prolata (teleomorph: Setosphaeria prolata)	
10	Graphium penicillioides, Leptosphaeria maydis, Leptothyrium zeae, Ophiosphaerella herpotricha, (anamorph: Scolecosporiella sp.), Paraphaeosphaeria michotii, Phoma sp., Septoria zaeae, S. zeicola, S. zeina	
15	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	Setosphaeria turcica (anamorph: Exserohilum turcicum = Helmin- thosporium turcicum)
20	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	Cochliobolus carbonum (anamorph: Bipolaris zeicola = Helminthosporium carbonum)
25	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	Penicillium spp., P. chrysogenum, P. expansum, P. oxalicum
30	Phaeocytostroma stalk rot and root rot	Phaeocytostroma ambiguum, = Phaeocyto- sporella zaeae
35	Phaeosphaeria leaf spot	Phaeosphaeria maydis = Sphaerulina maydis
40	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	Botryosphaeria festucae = Physalospora zeicola (anamorph: Diplodia frumenti)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenophaeta stalk rot and root rot	Phoma terrestris = Pyrenophaeta terrestris
	Pythium root rot	Pythium spp., P. arrhenomanes, P. graminicola
	Pythium stalk rot	Pythium aphanidermatum = P. butleri L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	Epicoccum nigrum
	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	Rhizoctonia zaeae (teleomorph: Waitea circinata)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	Rhizoctonia solani, Rhizoctonia zaeae

	Erkrankung	Pathogen
5	Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
10		
15	Rostratum leaf spot (<i>Helminthosporium</i> leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
20	Rust, common corn	Puccinia sorghi
	Rust, southern corn	Puccinia polyspora
	Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zaeae = Angiopsora zaeae
25	Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
30	Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zaeae (anamorph: F. graminearum), Macrohomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zaeae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
35	Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
	Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
	Shuck rot	Myrothecium gramineum
40	Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
	Smut, common	Ustilago zaeae = U. maydis
	Smut, false	Ustilaginoidea virens
	Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
	Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
	Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematoxocca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
15	Tar spot	Phyllachora maydis
	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocreia sp.
	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
20	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei snapdragon (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolium), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerotophthora macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotium* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an 15 Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, 25 Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* 30 (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und 45 Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f. sp. hordei) und Weizen (f. sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotiorum (Weißstengelfäule, Rapskrebs), Septoria nodorum und 5 Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblütlern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 3: Bakterielle Erkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Bacterial leaf blight and stalk rot	Pseudomonas avenae subsp. avenae
	Bacterial leaf spot	Xanthomonas campestris pv. holcicola
25	Bacterial stalk rot	Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens
	Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia chrysanthemi pv. zae
	Bacterial stripe	Pseudomonas andropogonis
	Chocolate spot	Pseudomonas syringae pv. coronafaciens
30	Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv. andnebraskense
	Holcus spot	Pseudomonas syringae pv. syringae
35	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
	Seed rot-seedling blight	Bacillus subtilis
	Stewart's disease (bacterial wilt)	Pantoea stewartii = Erwinia stewartii
40	Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	Spiroplasma kunkelii

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien:

45 Corynebacterium sepedonicum (Bakterienringfäule an Kartoffel), Erwinia carotovora (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), Erwinia amylovora (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), Streptomyces

scabies (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

3. Virale Pathogene:

10

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder Cucumber-Mosaic Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

15

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 4: Virale Erkrankungen

20

Krankheit	Pathogen
American wheat stripe (wheat stripe mosaic)	American wheat stripe mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCVBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)

	Krankheit	Pathogen
	Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
5	Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
	Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
	Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
10	maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
	Maize red leaf and red stripe	Mollicute
	Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
	Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
15	Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
	Maize rough dwarf (nanismo ruivido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
	Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
20	Maize streak	Maize streak virus (MSV)
	Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
	Maize stunting	Maize stunting virus
25	Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
	Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
	Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
	Maize white leaf	Maize white leaf virus
30	Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
	Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
	Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
	Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
35	Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
	Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
	Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
40	Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
	Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
	Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
45	Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, 10 Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer (ECB)), *Diabrotica barberi* ("northern corn rootworm"), *Diabrotica undecimpunctata* ("southern corn rootworm"), *Diabrotica virgifera* 15 ("Western corn rootworm"), *Agrotis ipsilon* ("black cutworm"), *Crymodes devastator* ("glassy cutworm"), *Feltia ducens* ("dingy cutworm"), *Agrotis gladiaria* ("claybacked cutworm"), *Melanotus* spp., *Aeolus mellillus* ("wireworm"), *Aeolus mancus* ("wheat wireworm"), *Horistonotus uhleri* ("sand wireworm"), 20 *Sphenophorus maidis* ("maize billbug"), *Sphenophorus zeae* ("timothy billbug"), *Sphenophorus parvulus* ("bluegrass billbug"), *Sphenophorus callosus* ("southern corn billbug"), *Phyllophaga* spp. ("white grubs"), *Anuraphis maidiradicis* ("corn root aphid"), *Delia platura* ("seedcorn maggot"), 25 *Colaspis brunnea* ("grape colaspis"), *Stenolophus lecontei* ("seedcorn beetle") und *Clivinia impressifrons* ("lender seedcorn beetle").

30 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Große Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

4.2 Nematoden:

35 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

40 Tabelle 6: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
45 Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. zea, Punctodera chalcoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
10	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. zea
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

25

Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

40 1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (Barley Powdery Mildew), barley yellow dwarf virus (BYDV),

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Schizaphis graminum* (greenbug); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Euschistus servus* (brown stink bug); *Deliaplatura* (seedcorn maggot); *Mayetiola destructor* (Hessian fly); *Petrobia latens* (brown wheat mite).

2. Sojabohne:

10 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp.*glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffussa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*.

25 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens* (soybean looper); *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar); *Plathypena scabra* (green cloverworm); *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle); *Myzus persicae* (green peach aphid); *Empoasca fabae* (potato leaf hopper); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Hylemya platura* (seedcom maggot); *Sericothrips variabilis* (soybean thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Tetranychus turkestanicus* (strawberry spider mite); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite);

40

3. Canola:

45 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicaceae*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassiccola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

4. Alfalfa:

5 Pilz,, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregularis*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*,

10 *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

5. Weizen:

15 Pilz-,bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*,

20 *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercosporella herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium gramicola*, *Pythium aphanidermatum*, High Plains Virus, European wheat striate virus, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria (Erysiphe) graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)

40 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata* (army worm); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Agrotis orthogonia* (western cutworm); *Elasmopalpus Zignosellus* (lesser cornstalk borer); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Hypera punctata* (clover leaf weevil); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); Russian wheat aphid; *Schizaphis graminum* (greenbug); *Macrosiphum avenae* (English grain aphid); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper);

Melanoplus differentialis (differential grasshopper);
Melanoplus sanguinipes (migratory grasshopper); Mayetiola
destructor (Hessian fly); Sitodiplosis mosellana (wheat
midge); Meromyza americana (wheat stem maggot); Hylemya
5 coarctata (wheat bulb fly); Frankliniella fusca (tobacco
thrips); Cephus cinctus (wheat stem sawfly); Aceria tulipae
(wheat curl mite);

6. Sonnenblume:

10 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Plasmophora
halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria
helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alter-
naria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macro-
15 phomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae,
Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi,
Verticillium dahliae, Erwinia carotovorum p.v. Carotovora,
Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo
tragopogonis.

20 Pathogene Insekten / Nematoden: Suleima helianthana (sun-
flower bud moth); Homoeosoma electellum (sunflower moth);
zygogramma exclamationis (sunflower beetle); Bothyrus
gibbosus (carrot beetle); Neolasioptera murtfeldtiana
25 (sunflower seed midge);

7. Mais:

30 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Fusarium monili-
forme var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium monili-
forme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum), Stenocarpella
maydi (Diplodia maydis), Pythium irregulare, Pythium debarya-
num, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum,
Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis
35 0, T (Cochliobolus heterostrophus), Helminthosporium carbonum
I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I,
II & III, Helminthosporium pedicellatum, Physoderma maydis,
Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi,
Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macro-
40 phomina phaseolina, Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae,
Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inae-
qualis, Curvularia pallens, Clavibacter michiganense subsp.
nebraskense, Trichoderma viride, Maize Dwarf Mosaic Virus A
& B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus,
45 Claviceps sorghi, Pseudonomas avenae, Erwinia chrysanthemi
p.v. Zea, Erwinia corotovora, Cornstunt spiroplasma, Diplodia
macrospora, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora

sorghii, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus,
5 Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Spodoptera frugiperda*. (fall armyworm); *Diatraea grandiosella* (southwestern corn borer); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Diatraea saccharalis* (sugarcane borer); *Diabrotica virgifera* (western corn rootworm); *Diabrotica longicornis barbieri* (northern corn rootworm); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); *Melanotus spp.* (wireworms); *Cyclocephala borealis* (northern masked chafer; white grub); *Cyclocephala immaculata* (southern masked chafer; white grub); *Popillia japonica* (Japanese beetle); *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Anuraphis maidiradicis* (corn root aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus sanguinipes* (migratory grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot);
20 *Agromyza parvicornis* (corn blot leafminer); *Anaphothrips obscurus* (grass thrips); *Solenopsis milesta* (thief ant); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite).

30 8. Sorghum:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerotophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,

Sclerospora graminicola, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Pathogene Insekten / Nematoden: Chilo partellus (sorghum borer); Spodoptera frugiperda (fall armyworm); Helicoverpa zea (corn ear-worm); Elasmopalpus lignosellus (lesser corn-stalk borer); Feltia subterranea (granulate cutworm); Phyllophaga crinita (white grub); Eleodes, Conoderus und Aeolus spp. (wireworm); Oulema melanopus (cereal leaf beetle); Chaetocnema pulicaria (corn flea beetle); Sphenophorus maidis (maize billbug); Rhopalosiphum maidis (corn leaf aphid); Siphanta (yellow sugarcane aphid); Blissus leucopterus leucopterus (chinch bug); Contarinia sorghicola (sorghum-midge); Tetranychus cinnabarinus (carmine spider mite); Tetranychus urticae (two spotted spider mite).

9. Baumwolle:

Pathogene Insekten / Nematoden: Heliothis virescens (cotton budworm); Helicoverpa zea (cotton bollworm); Spodoptera exigua (beet armyworm); Pectinophora gossypiella (pink bollworm); Anthonomus grandis grandis (boll weevil); Aphis gossypii (cotton aphid); Pseudatomoscelis seriatus (cotton fleahopper); Trialeurodes abutilonea (bandedwinged whitefly); Lygus lineolaris (tarnished plant bug); Melanoplus femur-rubrum (redlegged grasshopper); Melanoplus differentialis (differential grasshopper); Thrips tabaci (onion thrips); Frankliniella fusca (tobacco thrips); Tetranychus cinnabarinus (carmine spider mite); Tetranychus urticae (two-spotted spider mite);

10. Reis:

Pathogene Insekten / Nematoden: Diatraea saccharalis (sugarcane borer); Spodoptera frugiperda (fall armyworm); Helicoverpa zea (corn earworm); Colaspis brunnea (grape colaspis); Lissorhoptrus oryzophilus (rice water weevil); Sitophilus oryzae (rice weevil); Nephrotettix nigropictus (rice leafhopper); Blissus leucopterus leucopterus (chinch bug); Acrosternum hilare (green stink bug);

11. Raps:

Pathogene Insekten / Nematoden: Brevicoryne brassicae (cabbage aphid); Phylotreta cruciferae (Flea beetle); Mamestra configurata (Bertha armyworm); Plutella xylostella (Diamond-back moth); Delia ssp. (Root maggots).

"NADPH-Oxidase" meint im Rahmen der Erfindung all solche Enzyme, die als wesentliche Eigenschaft befähigt sind mittels eines Einzelelektronentransfers molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. Bevorzugt sind die Enzyme die durch die EC-5 Klasse E.C.1.23.45.3 beschrieben werden. Dabei kann die NADPH-Oxidasen aus einem oder mehr Polypeptiden bestehen, die gleich oder unterschiedlich sein können.

Bevorzugt ist die NADPH-Oxidase ein Flavocytochromprotein und 10 umfasst als prosthetische Gruppen ein Cytochrom b und/oder eine FAD Einheit. Die NADPH-Oxidase kann aus einem $\alpha 1\beta 1$ Heterodimer bestehen, wobei die β Untereinheit die funktionelle Untereinheit des Flavocytochroms darstellen und als Glykoprotein die Elektronentransportkomponenten umfassen kann (eine hydrophile, zytosolische, C-terminale Domäne, welche NADPH und FAD enthält, sowie 15 4 bis 6 N-terminale, putative Transmembrane- α -Helixen, welche zwei Histidin-komplexierte prosthetische Haem-Gruppen enthält). Die α -Untereinheit kann eine C-terminale, Prolin-reiche Sequenz umfassen, welche potentielle zytosolische, aktivierende Faktoren 20 der NADPH-Oxidase zu binden vermag. Durch die Bindung der zytosolischen phox Proteine (z.B. p47-phox, p67-phox, p40-phox) und p21rac - ein GTP-bindendes Protein - kann Aktivierung erfolgen.

Dem Fachmann sind zahlreiche NADPH-Oxidasen aus pflanzlichen 25 Organismen bekannt (u.a. Torres MA et al. (1998) Plant J 14: 365-370). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die Sequenzen mit nachfolgenden GenBnk Acc.-No. zu nennen: AJ251717 (Hordeum vulgare), AP003560 (Oryza sativa var. japonica), AJ320505 (Nicotiana tabacum), AB050660 (Solanum tuberosum), 30 AF088276 (Lycopersicon esculentum), AB008111 (Arabidopsis thaliana; Atrboh F), AF055357 (Arabidopsis thaliana; RbohD), AJ309006 (Nicotiana tabacum; rboh), AP003271 (Oryza sativa cv. japonica), AF055355 (Arabidopsis thaliana; RbohC), AF055353 (Arabidopsis thaliana; RbohA). Insbesondere bevorzugt sind die NADPH-35 OXIDASEN, die eine Sequenz gemäß SEQ ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 umfassen.

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. 40 durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonder - leicht aufgefunden werden. Beispielhaft seien dabei Sequenzen mit nachfolgenden GenBnk Acc.-No. zu nennen: CAC51517.1, AJ251717, T03973, BAB68079.1, AP003560, T02024, CAC87256.1, 45 AJ320505, BAB70750.1, AB050660, AF088276_1, NP_564821.1, N M_105079, T00265 AC007764_16, NP_192862.1, NM_117194, AF147783_1, AAM28891.1, AF506374, CAC84140.1, AJ309006, T51804, NP_199602.1,

NM_124165, BAB89740.1, AP003271, AAC39477.1, AF055355,
NP_199919.1, NM_124485, AAC39475.1, AF055353, NP_196356.1,
NM_120821, NP_194239.1, NM_118641, BAB08369.1, AB015475,
AAC39478.1, AF055356, AC069143_9, NP_173357.1, NM_101781,
5 NP_172383.1, NM_100780, AAB70398.1, AC000106, AAC39476.1,
AF055354, BAB70751.1, AB050661, BAB63664.1, AP003275, AAD24966.1,
AF109150.

Besonders bevorzugt umfasst die Polypeptidsequenz der NADPH-
10 Oxidase mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe
von Sequenzmotiven bestehend aus

- i) AL(K/R)GL(K/R)
- ii) DK(N/D)XDG(R/K)(I/L/V)(T/N)E
- 15 iii) LSASAN
- iv) IMEELDP
- v) K(F/L)NMA(I/L)(I/V)LXPVCRN
- vi) (E/Q)WHPFSIT
- vii) S(A/S)PXDD(Q/Y)(L/I)S(I/V)H(V/I/L)R
- 20 viii) DGPYGS(S/A)PAGDY
- ix) L(I/V)GLGIGATP
- x) FYWVTREQGSF
- xi) GVFYCG

25 Ganz besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2 oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der Sequenzmotive i), ii), iii), iv), v), vi), vii), viii), ix) x) und xi). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Amino-
30 säuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

NADPH-Oxidase kann aber auch jede andere Einheit eines NADPH-Oxidase Enzymkomplexes meinen der wesentlich für Aktivität der
35 NADPH-Oxidase ist.

"Proteinmenge" meint die Menge eines NADPH-Oxidase-Polypeptides in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengenmäßige Verminderung der Menge einer NADPH-Oxidase in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders

bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

5 "Aktivität" meint die Fähigkeit einer NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. "Verminderung" der Aktivität meint die Verminderung der Gesamt-Aktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines
10 der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens
15 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

"Funktion" meint bevorzugt die Substratbindenkapazität einer
20 NADPH-Oxidase in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. Als Substrate kommen niedermolekulare Verbindungen wie NADPH oder FAD aber auch die Proteininteraktionspartner einer NADPH-Oxidase in Frage.

25 "Verminderung" der Funktion meint beispielsweise die mengenmäßige Verminderung der Bindenkapazität oder Bindestärke einer NADPH-Oxidase zu mindestens einem Substrat in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu
30 dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Unter Verminderung ist auch die Veränderung der Substratspezifität zu verstehen, wie sie beispielsweise durch den k_{cat}/K_m -Wert
35 ausgedrückt werden kann. Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %. Bindepartner für NADPH-Oxidase können
40 beispielsweise durch das Hefe-2-Hybridsystem in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge, der Aktivität von NADPH Oxidasen oder der Substratbindenkapazität sind dem Fachmann
45 bekannt. Beispielsweise kann die NADPH abhängige, DPI-inhibierbare O_2^- oder H_2O_2 Produktion (z.B. über Nitro-Blau-Tetrazolium [NBT] oder Cytochrom c Reduktion) gemessen werden. Die Protein-

menge kann beispielsweise immunologisch unter Verwendung entsprechender Antikörper bestimmt werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Yu L et al. (1999) Blood 94(7):2497-504; Doke N (1983a) Physiol Plant Pathol 23:345-357; Levine A et al. (1994)

5 Cell 79:583-593; Tenhaken R et al. (1995) Proc Nat Acad Sci USA 92: 4158-4163; Sagi M & Fluhr R. (2001) Plant Physiol 126(3):1281-90; Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant Microbe Interact 11:292-300; so wie in den vorgenannten Artikeln zitierten Referenzen).

10

“Funktionelle Äquivalente” eines NADPH-Oxidase-Proteins meint bevorzugt solche Sequenzen, die von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abgeleitet oder zu dieser homolog sind und

15 die gleichen wesentlichen Eigenschaften aufweisen.

Dabei kann die Effizienz der Pathogenresistenz sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassen eine Polypeptidse-

20 quenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abweichen. Bevorzugt sind solche funktionelle Äquivalente, bei denen sich die Effizienz der Pathogenresistenz - gemessen beispielsweise an der Penetrationseffizienz eines Pathogens (Haustoriumbildung) - um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %, 25 besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten unter Verminderung einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, bei deren Verminderung die Effizienz der Pathogenresistenz quanti-

30 tativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 übersteigt.

35

Der Vergleich wird bevorzugt unter analogen Bedingungen durch geführt. “Analoge Bedingungen” bedeutet, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Kultur- oder Zuchtbedingungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate, Pathogenkonzentration etc.) zwischen den zu vergleichenden Versuchen identisch gehalten werden und die Ansätze sich allein durch die Sequenz der zu vergleichenden NADPH-Oxidasen, ihrem Ursprungorganismus und gegebenenfalls dem Pathogen unterscheiden. Bei Wahl des Pathogens ist für den Vergleich jeweils das Pathogen 45 zu wählen, das dem jeweils anderen - unter Berücksichtigung der Artspezifität - am nächsten kommt.

"Funktionelle Äquivalente" meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen,

5 welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offebarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen (beispielsweise *Arabidopsis thaliana*) können z.B. durch

10 Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Sequenzen als Suchsequenz vzw. Sonde leicht aufgefunden werden. Entsprechende Sequenzen sind oben mit GenBank Acc-No. beispielhaft aufgeführt.

15 Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Polypeptides umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß

20 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 erhält.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des

25 Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

30 Gap Weight: 50 Length Weight: 3

Average Match: 10 Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie

35 von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

40 Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch:-2,003

5 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

10

Funktionelle Äquivalente, abgeleitet von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 durch Substitution, Insertion oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 15 mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem Polypeptid umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 und zeichnen sich durch die gleichen wesentlichen Eigenschaften 20 wie diese aus.

Funktionelle Äquivalente, abgeleitet einer eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 umfassenden NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz durch Substitution, Insertion 25 oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem der erfindungsgemäßen Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 und kodieren für Polypeptide mit den 30 gleichen wesentlichen Eigenschaften wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

Auch die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen-Bibliotheken 35 anderer Organismen, bevorzugt von den weiter unten genannten als Wirt zur Transformation geeigneten Pflanzenarten, unter Verwendung der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde, ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe 40 in anderen Arte zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten 45 bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,

13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

Funktionelle Äquivalente umfasst DNA Sequenzen, die unter 5 Standardbedingungen mit der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenzen, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder teilen der vorgenannten hybridisieren und als vollständige 10 Sequenzen für Proteine kodieren, die die gleichen wesentlichen Eigenschaften haben wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungsbedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 15 20 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrifftes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und 25 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrifftes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben 30 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegenwart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C 35 ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschritt sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden 40 Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 4X SSC bei 65°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)
- b) 6X SSC bei 45°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA),
- c) 6X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)

31

- d) 4XSSC, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)
- e) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
- f) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach stringente Bedingung).

5

(2) Waschschrifte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

- 10 a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
- b) 0,1X SSC bei 65°C.
- c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
- d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
- e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
- 15 f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

Die Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder der NADPH-Oxidase-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

20

"Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einer NADPH-Oxidase, einer NADPH-Oxidase Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische

25 Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen. Eine Verminderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung einer NADPH-Oxidase bis hin zu einem im wesentlichen

30 vollständigen Fehlen der NADPH-Oxidase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des NADPH-Oxidase-Proteins). Dabei können einer oder mehrere essentielle Einheiten der NADPH-Oxidase vermindert werden. Dabei wird die Expression 35 eines bestimmter NADPH-Oxidase oder die NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90% vermindert.

40 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion umfasst. Beispielshaft - jedoch nicht einschränkend - seien zu nennen:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nukleinsäuresequenz (NAox-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 5 b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein NADPH-Oxidase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein NADPH-Oxidase-Gen-
10 transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch α-anomere Nukleinsäuresequenzen.
- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
15
- d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
20
- e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase -Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
25
- f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- h) Einführen von Mutationen in endogenen NADPH-Oxidase Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)
35

Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der NADPH-Oxidase-Expression, NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-
40 Oxidase-Funktion im Sinne der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des NADPH-Oxidase-Proteins, des Transports des NADPH-Oxidase-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomen-
45 anlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines NADPH-

Oxidase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-elongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz
5 beschrieben:

a) Einbringung einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nuklein-säuresequenz (NAox-dsRNA)

10 Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; 15 WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Transformation gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. 20 25 Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der NADPH-30 Oxidase-Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher 35 auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Samen) die Verminderung eines NADPH-Oxidase bewirken.

40 Das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu 45 zumindest einem Teil einer NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

5 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribo-
10 nukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein, und

15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint NADPH-
20 Oxidase-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch
25 Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der NADPH-Oxidase Zielsequenz oder einer funktionell äquivalenten Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben (bzw. zwischen
30 35 dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben).

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen,
40 bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als
45 Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Speicherprotein Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B.

in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-
5 RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punkt-
mutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-
Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie min-
destens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt
mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "anti-
10 sense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz
kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles
Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA
15 transkribiert von einer für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein
funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäure-
sequenz, bevorzugt von einem NADPH-Oxidase-Gen. Dabei haben die
Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen,
bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens
20 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am
meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die
vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-
25 Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer
Pathogenresistenz in Pflanzen.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribo-
nukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des
30 Zucker-Phosphat-Gerüstes als auch der Nukleoside vorliegen. Bei-
spielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen
RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stick-
stoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahin-
gehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von
35 Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modi-
fikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung
von antisense-RNA beschrieben.

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch
40 mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben
definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle
oder den Organismus eingebracht werden.

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-
45 synthetisch hergestellt werden.

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder – bevorzugt – ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

5

Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein, das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptions-terminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

15

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

20 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit

25 dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann 35 die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in 40 einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor insertiert 45 und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom

einer Pflanze insertiert, um eine dauerhafte Expression der dsRNA zu gewährleisten.

Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden, 5 die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizientere Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität 10 zwischen dsRNA und einem NADPH-Oxidase Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der NADPH-Oxidase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie 15 infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der NADPH-Oxidase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die NADPH-Oxidase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenz- 20 homologie zwischen den NADPH-Oxidase Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der NADPH-Oxidase Sequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 25 oder 21 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen NADPH-Oxidase-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten mög- 30 lich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten NADPH-Oxidase-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer NADPH-Oxidase-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen ver- 35 wandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von NADPH-Oxidase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

40 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Poly- 45 adenylierungssignal) gebracht werden. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Poly-

adenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden.

5 Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder
10 enzymatisch in vitro synthetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die
15 Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA realisiert, transformiert. Entsprechende Verfahren sind weiter unten beschrieben.
20

b) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz

Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Verhinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit
25 der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende NADPH-Oxidase-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch
30 der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende NADPH-Oxidase-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomischer DNA - durch
35 Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung
40 eines NADPH-Oxidase-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21, nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden.
45 Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem

Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Anti-sense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense Nukleinsäuresequenz eine erhöhte bio-chemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, β -D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β -D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines NADPH-Oxidase-Gens (z.B. einem NADPH-Oxidase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des NADPH-Oxidase-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

45 In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppel-

strängige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

c) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz
10 kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozymsequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) Nature 334:585-591.

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. NADPH-Oxidase - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden NADPH-Oxidase Proteins aufweisen

(siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

5

d) Einbringung einer NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenz zur Induktion eines Kosuppression

Die Expression einer NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz in sense-
10 Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol
15 Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise
20 representieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.

25 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß
30 SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 .

e) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase Gene, -RNAs oder Proteine

35 Eine Verminderung einer NADPH-Oxidase Genexpression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken
40 eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen NADPH-Oxidase Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001)
45 J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem

275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628- 14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616 -3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

10

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines NADPH-Oxidase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder – ausgehend von einer NADPH-Oxidase cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich.

15 20 Die dazu erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann geläufig.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das NADPH-Oxidase Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in genetisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

35 40 45 50 55 Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Gensequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol

Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

5

f) Einbringung von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die NADPH-Oxidase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen NADPH-Oxidase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu den zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).

g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.

Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter NADPH-Oxidase-Aktivität verwendet man beispielsweise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen NADPH-Oxidase Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und verhindert wird.

Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird der Wirts-

organismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus *E. coli* und das R/R_S System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378)

25

h) Einführung von Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der NADPH-Oxidase-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosocharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeroplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der NADPH-Oxidase-Funktion

oder Aktivität mit dominant-negativen NADPH-Oxidase-Varianten sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz

5 (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAi-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. Auf-

10 grund der hohen Homologie zwischen den NADPH-Oxidase-Proteinen aus Mais, Reis und Gerste kann auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Protein bei Pflanzen geschlossen werden. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenzen aus Gerste, Mais oder Reis auch die Expression von

15 homologen NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen Arten effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden NADPH-Oxidase-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen

20 Varianten eines NADPH-Oxidase-Proteins aus Reis, Mais oder Gerste die Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine

25 Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder Proteinaktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum

30 Einsatz kommenden Nukleinsäuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

"Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung, direkt oder

35 indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen

40 oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes

45 NADPH-Oxidase Gen). Die Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein

(z.B. Bindungsfaktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.

5 Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

"Anti-NADPH-Oxidase" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression

10 (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer NADPH-Oxidase-dsRNA oder einer NADPH-Oxidase "antisense"-RNA – bevorzugt in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe, Organ oder Samen derselben – bedingen.

15 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontroll- element (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression

20 in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet.

Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise die NADPH-Oxidase dsRNA) dort in plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispiels-

25 weise Promotoren) bevorzugt. Die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden (wie in Beispiel 6 und 7 beschrieben). In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise

30 Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-NAox-Ver-

35 bindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense 40 oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevor-
45 zugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander

verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden,

10 wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al.

15 (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten

20 Restriktionsenzymeschnittstellen oder eines Signalpeptides haben.. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und

25 durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen ein Promoter - zum Beispiel

30 durch eine homologe Rekombination - hinter ein endogenes NADPH-Oxidase-Gen platziert wird, und durch Expression einer antisense NADPH-Oxidase-RNA die erfundungsgemäße Verminderung eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirkt wird. Analog kann auch eine "anti-NADPH-Oxidase" Verbindung (zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz

35 kodierend für eines NADPH-Oxidase dsRNA oder eine NADPH-Oxidase antisense RNA) derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.

40 Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

5 Bevorzugt sind Vektoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen 10 Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. 15 (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"- 20 Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen 25 et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von 30 Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

35

b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

40

Samenspezifische Promotoren umfassen zum Beispiel den Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirras A et al. (1989)

45 Mol Gen Genet 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519),

des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), des Legumin B4 (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), des Oleosin aus Arabidopsis 5 (WO 98/45461) und des Bce4 aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine 10 spezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2- oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, 15 des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Patatin Promotor Klasse I (B33) und 20 den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), den SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-25 carboxylase) oder den ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind Epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:101-112).

30 Blütenspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

35 Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren
40 Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Beispielhaft seien zu nennen 45 der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein

durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334).

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (bzw. *gst1* Promotor) z.B. aus Kartoffel (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361- 366), der hitzeinduzierbare *hsp70*- oder *hsp80*-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor. Weitere pathogen-induzierbare Promotoren umfassen den Flachs *Fis1*-Promotor (WO 96/34949), den Vst1-Promotor (Schubert et al. (1997) Plant Mol Biol 34:417-426) sowie den EAS4 Sesquiterpene-Cyclase-Promotor aus Tabak (US 6,100,451).

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen ferner die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden, wie beispielsweise Promotoren der Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

Umfassst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des *pinII* Gens (EP-A 0 375 091; Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des *wun1*- und *wun2*-Gens (US 5,428,148), des *win1*- und *win2*-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

Eine Quelle für weitere pathogen-induzierbare Promotoren stellt die PR-Genfamilie dar. Eine Reihe von Elementen in diesen Promotoren haben sich als vorteilhaft erwiesen. So vermittelt die

Region -364 bis -288 im Promotor von PR-2d Salicylat-Spezifität (Buchel et al. (1996) Plant Mol Biol 30, 493-504). Die Sequenz 5'-TCATCTTCTT-3' taucht im Promotor der Gersten β -1,3-Glucanase und in mehr als 30 weiteren stress-induzierten Genen wiederholt auf. Diese Region bindet in Tabak ein nukleäres Protein, dessen Abundanz durch Salicylat erhöht wird. Die PR-1-Promotoren aus Tabak und Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) eignen sich ebenfalls als pathogen-induzierbare Promotoren. Bevorzugt, da besonders spezifisch durch Pathogen-induziert, sind die "acidic 10 PR-5"- (aPR5)-Promotoren aus Gerste (Schweizer et al. (1997) Plant Physiol 114:79-88) und Weizen (Rebmann et al. (1991) Plant Mol Biol 16:329-331). aPR5-Proteine akkumulieren in ca. 4 bis 6 Stunden nach Pathogenbefall und zeigen nur eine sehr geringe Hintergrundsexpression (WO 99/66057). Ein Ansatz, um eine erhöhte 15 pathogen-induzierte Spezifität zu erreichen, bildet die Herstellung synthetischer Promotoren aus Kombinationen von bekannten pathogen-responsiven Elementen (Rushton et al. (2002) Plant Cell 14, 749-762; WO 00/01830; WO 99/66057). Weitere pathogen-induzierbare Promotoren aus verschiedenen Arten sind dem 20 Fachmann bekannt (EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041 148; EP-A 1 032 684;

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

25 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungs-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungs-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebe-spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe 30 naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive, sowie Blatt und/oder Stengel-spezifische, pathogen-induzierbare und epidermis-spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbar und epidermis-35 spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen 40 Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren 45 enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit

zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in 5 prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-strom-aufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz den Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

10 15 Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionssteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren 20 erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wassersstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.

25 Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

30 35 Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-

40 45 Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere 45 sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen

zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im 5 Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACHS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalatin-Synthase)-Terminator. 10 15

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der 20 natürliche Promoter eines bestimmten Gens gegen einen Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus 25 (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten 30 Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber 35 nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbizide, wie zum 40 Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinotricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbicide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und 45 Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthase-gene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphono-

methyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende 5 Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycin- 10 phosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht 15 (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Grosskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 30 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β-Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das 35 die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 40 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die β-Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).
c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispielhaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori

(Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in 10 einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die Expressionskassetten enthalten sind. Die Expressionskassette kann in den Vektor (zum 15 Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse 20 und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobacterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

30 Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.

35 Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten 40 Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen er- 45 folgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Ver-

fahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhouse et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al.(1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) 10 Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation 15 genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplasten- transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und 20 die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden. 25 Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

30 Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischen- vektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, 35 meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren 40 können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter pflanzlicher Organismen (s.o.) und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium 45 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Außerhalb der T-DNA Region können Elemente wie ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter Agro-

bakteria oder E.coli (z.B. nptIII) umfasst sein. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; 10 An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignet Promotoren sind 15 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus 20 und Zelltyp eignen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die 25 der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist er erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Markergen befindet.

30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz 35 gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum, Herbizid oder ein Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat WO 98/45456) verleiht(s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder 40 Herbicides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, 45 das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von

untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise ge-
züchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten
kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Inte-
gration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in
Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic
Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von
10 SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus
(1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vor-
zugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor
kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans-
formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids
15 Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann
eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann be-
kannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft
20 von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zell-
massen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise
induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt
und gezüchtet werden.

25 Dem Fachmann sind such Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen,
Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise
werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)
Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell
Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533
30 verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Ver-
fahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten,
Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Stressresistenz oder eine
35 andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken
kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM,
Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51
Spec No; Seite 487-96.

40 "Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäure-
sequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend
besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert
mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder
Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene
45 Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- 5 c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zu mindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 20 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des NADPH-Oxidase-Promotors mit dem entsprechenden NADPH-Oxidase-Gen - wird zu einer trans-25 genen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

30 Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.-
35 oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen.

40 Bevorzugt sind

- a) Pilze, wie Aspergillus, Eremotheicum, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Eng. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet Ashbya gossypii oder Eremotheicum ashbyii.
- 45

b) Hefen wie *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*, besonders bevorzugt sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* (ATCC Accession No. 201178),

5 c) Pflanzen gemäß der obengenannten Definition für "Pflanzen"

d) Vertebraten und Invertebraten. Besonders bevorzugte Vertebraten sind nicht-humane Säuger wie in Hund, Katze, Schaf, Ziege, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd. Bevorzugte

10 tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Bevorzugte Invertebraten umfassen Insektenzellen wie *Drosophila S2* und *Spodoptera Sf9* oder *Sf21* Zellen,

e) prokaryontische Organismen wie gram-positive oder gram-negative Bakterien wie *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cyanobacter*, *Escherichia* (vor allem *Escherichia coli*), *Serratia*, *Staphylococcus*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Penicillium* oder *Klebsiella* genannt.

20 Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des

25 Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife

30 Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. Insbesondere als Wirtsorganismen bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, auf die der erfindungsgemäße Verfahren zum Erzielen einer Pathogenresistenz gemäß oben genannten Kriterien angewendet werden kann. Ganz besonders bevorzugt sind monokotyle Pflanzen wie Weizen,

35 Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, als diktoyledone Kulturpflanzen wie Raps, Canola, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat,

40 Calendula, Melone, Kürbis oder Zucchini.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinannten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei 10 ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus ge-15 züchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und 20 Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM 25 (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

Sequenzen

30 1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
35 3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis
(*Oryza sativa* var. *japonica*)
40 4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis
(*Oryza sativa* var. *japonica*)
45 5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum*

6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Nicotiana tabacum

7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Kartoffel
5 (Solanum tuberosum)

8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Kartoffel
10 (Solanum tuberosum)

9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Tomate
(Lycopersicon esculentum)

15 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase aus Tomate
(Lycopersicon esculentum)

20 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Arabidopsis thaliana (RbohF)

12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase Arabidopsis
25 thaliana (RbohF)

13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Arabidopsis thaliana (RbohD)

30 14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase Arabidopsis
thaliana (RbohD)

15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Nicotiana tabacum (rboh)
35

16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Nicotiana tabacum (rboh)

40 17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis
(Oryza sativa var. japonica)

18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis
45 (Oryza sativa var. japonica)

19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohC)

20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für eine
5 NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis thaliana* (RbohC)

21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohA)

10 22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für eine
NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis thaliana* (RbohA)

15 23. SEQ ID NO: 23 Oligonukleotidprimer 5' NAOX
5'-GARCAAGGCTTTGATTG-3'

24. SEQ ID NO: 24 Oligonukleotidprimer 3' Naox
5'-GAAATGCTCCTTATGGAATTTC-3'

20

Abbildungen

Fig. 1: "RNA Interference" mit pNAox-dsRNA vermindert die Penetrationseffizienz des Echten Gerstenmehltau
25 BghA6 in Gerste.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) wurde in fünf individuellen Experimenten bei Inkokulation mit *Bgh* aus Gerste cv Pallas bestimmt. Die RPE errechnet sich als Differenz aus der
30 Penetrationseffizienz bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen und der Penetrationseffizienz bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

35

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

40

$$\%-\text{RPE} = 100 * (\text{RPE}-1)$$

45

Die Säulen "1" bis "5" stellen die %-RPE (d.h. die Abweichung der Penetrationseffizienz vom Durchschnitt der Penetrationseffizienz der Kontrolle) bei Evaluierung von mindesten 100 Interaktionsstellen für jeweils ein unabhängiges Experiment dar. Die Säule "m" stellt die durchschnittliche %-RPE der Experimente dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

"Control-dsRNA" stellt die parallelen Experimente mit einer Kontroll-dsRNA. "pNAox"-dsRNA stellt die Experimente mit der dsRNA der NADPH-Oxidase aus Gerste dar.

5 Die %-RPE war in Zellen, die mit pNAox-dsRNA beschossen wurden, deutlich (Signifikanz p=0,0054) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-dsRNA (TR: humaner Thyroid-rezeptor-dsRNA) bombardiert wurden.

10 Beispiele

Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, 15 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren 20 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhrts. 25 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

30 Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

Die Sorte Pallas wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben, 35 (Kölster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).

Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8 cm) in Fruhstorfer Erde vom Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 16 bis 18°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis 45 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen

verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente
5 wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C, nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

10 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde Echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer. f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLÜ Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidia/mm².

20 Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm mit ca. 100 Konidien/mm² (soweit nicht anders angegeben).

25 Beispiel 2: Klonierung der pNAox cDNA Sequenz aus Gerste

Die zur Isolation der HvpNAox cDNA, ihrer Klonierung, Sequenzierung und Herstellung von Sonden benötigten cDNA
30 Fragmente wurden mittel RT-PCR unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland oder Qiagen, Hilden, Deutschland) erhalten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Gerste-Sämlingen als Matrize verwendet. Die RNA wurde aus Pallas 3, 5 und 7 Tage nach Keimung isoliert. Darüberhinaus wurde RNA
35 aus Pallas und den rückgekreuzten Linien mit *mlo5*, *Mlg* oder *Mla12* 1, 2 und 5 Tage nach Inokulation mit BghA6 am 7 Tag nach Keimung isoliert. Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die von konservierten Regionen der gp91phox Homologen aus Reis und *Arabidopsis thaliana* abgeleitet sind (GenBank Acc.-No.: X93301 bzw.

40 AB008111):

5' NAOX: 5'-GARCAAGGCTTTTGATTG-3' (SEQ ID NO: 23) und

3' Naox: 5' GAAATGCTCCTTATGGAATTC 3' (SEQ ID NO: 24)

Für die Reaktion (25 µL-Ansatz) wurden je 1000 ng Gesamt-RNA, 0,4 mM dNTPs, je 0,6 mM OPN-1 und OPN-2 Primer, 10 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Enzymmix in 1x RT-Puffer (*one step RT-PCR Kit*, Qiagen, Hilden) eingesetzt.

5

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet (PTC-100TM Modell 96V; MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts):

- 1 Zyklus mit 30 min bei 50°C
- 10 1 Zyklus mit 150 sec bei 94°C
- 30 Zyklen mit 94°C für 45 sec, 55°C für 1 min
und 72°C für 2 min
- 1 Zyklus mit 72°C für 7 min

- 15 Die PCR Produkt wurde mittels 2% w/v Agarosegelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein RT-PCR Produkt von 378 bp erhalten (SEQ ID NO: 1), das ein teil des offenen Leseraster der NADPH-Oxidase aus Gerste kodiert. Die entsprechende cDNA wurde aus einem Agarosegel isoliert und in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland) mittels T-Überhang-Ligation kloniert. Die cDNAs wurden ausgehend von der Plasmid-DNA unter Verwendung des "Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham, Freiburg, Deutschland) sequenziert. Das Konstrukt wurde mit pGEM-T-pNAox bezeichnet.
- 20
- 25

Beispiel 3: In vitro Synthese der pNAox dsRNA

Das Plasmid pGEM-T-pNAox, das für die in vitro RNA-Transkription eingesetzt wurde, beinhaltet den T7 und SP6 Promotor an den jeweiligen Enden der insertierten Nukleinsäuresequenz, was die Synthese von sense- bzw. antisense RNA ermöglicht. Das Plasmide kann mit geeigneten Restriktionsenzymen (ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase) linearisiert werden, um eine korrekte Transkription der insertierten Nukleinsäuresequenz zu gewährleisten und ein Durchlesen in vektorielle Sequenzen zu verhindern. Dazu wurden 10 µg pGEM-T-pNAox Plasmid-DNA jeweils mit ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase geschnitten. Die geschnittenen Plasmide werden in 200 µl Wasser mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß (RNase frei) transferiert und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. 180 µl der Plasmid-Lösung wurden mit 420 µl Ethanol versetzt, auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 g und - 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 10 µl TE Puffer aufgenommen.

- 30
- 35
- 40
- 45

Die jeweiligen Präparationen wurden direkt in eine in vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase bzw. SP6-RNA-Polymerase

eingesetzt. RNA Polymerasen wurden von Roche Molecular Biology, Mannheim, Deutschland bezogen.

Jeder Transkriptionsansatz beinhaltete in einem Volumen of 40 µl:

5

- 2 µl linearisierte Plasmid DNA (1 µg)
- 2 µl NTP's (25 mM) (1,25 mM von jedem NTP)
- 4 µl 10xReaktionspuffer (Roche Molecular Biology),
- 1 µl RNAsin RNAsin (27 Units; Roche Molecular Biology),
- 10 2 µl RNA Polymerase (40 Units)
- 29 µl DEPC-Wasser

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde jeweils ein Teil der Reaktionsansätze aus der Transkription des "sense"- bzw. "anti-sense"-Stranges gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend durch Abkühlung über 30 min auf eine Endtemperatur von 37°C miteinander hybridisiert ("annealing"). Alternativ kann nach der Denaturierung das Gemisch aus sense- und antisense-Strang auch für 30 min bei -20°C gekühlt werden. Das Protein-präzipitat, das sich während Denaturierung und Hybridisierung bildet wurde durch kurze Zentrifugation bei 20800 g abgetrennt und der Überstand direkt zur Beschichtung von Wolframpartikeln verwendet (s. unten). Zur Analyse wurden jeweils 1 µl jeden RNA-Stranges und der dsRNA auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel 25 aufgetrennt. Eine erfolgreiche Hybridisierung zeigte sich, durch eine Bandenverschiebung zu höherem Molekulargewicht im Vergleich zu den Einzelsträngen.

4 µl der dsRNA wurden Ethanol-präzipitiert (durch Zugabe von 6 µl 30 Wasser, 1 µl 3M Natriumacetat-Lösung und 25 µl Ethanol, sowie Zentrifugation für mindestens 5 min bei 20000 g und 4°C) und in 500 µl Wasser resuspendiert. Das Absorbtionsspektrum zwischen 230 und 300 nm wurde gemessen, bzw. die Absorption bei 280 und 260 nm bestimmt, um die Reinheit und die Konzentration der dsRNA 35 zu bestimmen. In der Regel wurden 80 bis 100 µg dsRNA mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis von 1,80 bis 1,95 erhalten. Ein Verdau mit DNase I kann optional durchgeführt werden, beeinflusst jedoch nachfolgende Ergebnisse nicht wesentlich.

40 Als Kontroll-dsRNA fungierte die dsRNA des humanen Thyroidezeptors (Ausgangsvektor pT7betaSal (Norman C et al. (1988) Cell 55(6):989-1003) zur Verfügung gestellt von Dr. Baniahmad, Institut für Genetik, Gießen, Deutschland; die Sequenz des Insert ist beschrieben unter der GenBank Acc.-No.: NM_000461). Für die 45 Herstellung der sense-RNA wurde das Plasmid mit PvuII, für die antisense-RNA mit HindIII verdaut und die RNA dann mit T7- bzw. SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Die einzelnen Verfahrens-

schritte zur Herstellung der Kontroll-dsRNA werden analog den oben für die pNAox-dsRNA beschriebenen durchgeführt.

Beispiel 4: Transiente Transformation, RNAi und Evaluation

5 der Pilzpathogenentwicklung

Gerste cv Pallas Blattsegmente wurden mit einer pNAox-dsRNA zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert.

Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inkokuliert und das

10 Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung in eben diesen Zellen beurteilt. In allen fünf Experimenten führte die Bombardierung von Gerste cv
15 Pallas mit pNAox-dsRNA zu einer verminderten Anzahl von erfolgreich durch Bgh penetrierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit einer fremden Kontroll-dsRNA (humaner Thyroidhormonrezeptor dsRNA, TR) bombardiert wurden. Der resistenzinduzierende Effekt der pNAox-dsRNA bedingte eine durchschnittliche Verminderung der
20 Penetrationseffizienz durch Bgh um 35 % (Fig. 4).

Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt das bereits für die biolistische Einführung von dsRNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer

25 P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1 µm (Partikeldichte 25 mg/ml) wurden mit dsRNA (Herstellung siehe oben) zusammen mit Plasmid-DNA des Vektors pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors)
30 als Transformationsmarker beschichtet. Dazu wurden pro Schuss die nachfolgender Mengen an dsRNA bzw. Reporterplasmid zur Beschichtung verwendet: 1 µg pGFP und 2 µg dsRNA. Doppelsträngige RNA wurde mittels Verschmelzens von "sense" und "antisense"-RNA *in vitro* synthetisiert (s.o.).

35

Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50 %igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert. Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuss 1 µg Plasmid, 2 µg dsRNA (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung
40 (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben,
45 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom

Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer rechteckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer Schweizer P, Institut für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuss bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6) inkokuliert und für weitere 40 bis 48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Blattsegmente wurden mit den beschichteten Partikeln unter Verwendung einer "particle inflow gun" bombardiert. Pro Schuss wurden 312 µg Wolframpartikel appliziert. 4 h nach der Bombardierung wurde Inokulation mit *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau (Rasse A6) inkokuliert und nach weiteren 40 h bezüglich der Infektionsanzeichen ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein reifes Haustorium und eine Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae") wurde mittels Fluoreszens- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 100 Conidia/mm² ergibt eine Angriffs frequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine

minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

5

1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.

10 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.

15 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,1 %

20 Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In pNAox-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein
25 Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei transformierten

30 Zellen (Transformation mit pNAox- oder Kontroll-dsRNA) und der Penetrationseffizienz bei untransformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

35

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\%-\text{RPE} = 100 * (\text{RPE}-1)$$

40

Der %-RPE-Wert (Abweichung von der durchschnittlichen Penetrationseffizienz der Kontrolle) dient der Bestimmung der Suszeptibilität von Zellen, die mit pNAox-dsRNA transfiziert sind (Fig. 4).

45

Bei der Kontroll-dsRNA wurde bei fünf unabhängigen Versuchen kein Unterschied zwischen der Transfektion mit der Kontroll dsRNA und Wasser bezüglich der Penetrationseffizienz von *Bgh* beobachtet.

5 Um einen Einfluss auf der dsRNA auf die Transformationsrate oder Überlebensrate der angegriffenen Zellen auszuschließen, wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen zwischen Kontroll- und pNAox-dsRNA Experimenten verglichen. Die pNAox-dsRNA hatten keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl- oder die Anzahl der ange-
10 griffenen GFP-exprimierenden Zellen.

Beispiel 5: Inhibition der NADPH-Oxidase mit Diphenyleniodonium-chlorid

15 Untermauert werden die Ergebnisse durch weitere Experimente mit dem NADPH-Oxidase Inhibitor Diphenyleniodoniumchlorid (DPI; Tabelle 1). Im allgemeinen wurden die Experimente durchgeführt wie von Hückelhoven und Kogel, 1998.

20 Tab. 1: Wirkung von DPI auf die Pathogenabwehr in Pallas^a

Art der Interaktion	Interaktionen (% ± Standardfehler)	
	Kontrolle ^b	200 µM DPI ^c
Penetration	68.25 ± 9.9	16.25 ± 0.5
Nicht-Penetration	24.25 ± 6.3	67.5 ± 9.5
HR (Hypersensitive Reaktion)	7.5 ± 3.7	16.25 ± 9.3

30 a DPI-Behandlung erfolgte 12 h nach Pathogen-Inokkulation, die Auswertung 36 h nach Inokkulation.
 b Kontrolle mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, mit DMSO Gehalt wie bei DPI Behandlung.
 35 c DPI gelöst in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, ausgehend von einer 10 mg/ml DPI Stammlösung in DMSO.

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet,
5 dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle derselben und
10
 - b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die NADPH-Oxidase kodiert wird durch
 - a) Polypeptidsequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22,
20 oder
 - b) Polypeptidsequenzen eines funktionellen Äquivalentes eines Polypeptides, welches eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 umfasst.
25
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das funktionelle Äquivalent eine Homologie von mindestens 50 % zu einem der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 hat.
30
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase gewährleistet wird durch Anwendung eines Verfahrens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten,
40
 - b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,

- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 5 d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 10 e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 15 f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- g) Einbringen von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen und
- 20 h) Einführung von Mutationen in ein endogenes NADPH-Oxidase Gen.

5.. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend

- 25 (i) die stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen aktiven Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für
 - a) eine doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Ribonukleinsäuresequenz oder
 - b) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz oder
 - 30 c) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder
 - d) eine NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder
 - 35 e) DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine
 - f) den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen

(ii) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und

(iii) Expression besagter Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend, um eine Pathogenresistenz 5 in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Pilzen, Insekten, Viren und Nematoden.

10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoramycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.

15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.

20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

25 10. Doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase umfassend

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase, und

30 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementären ist.

35 11. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach Anspruch 10, wobei die beiden RNA-Stränge der doppelsträngigen RNA kovalent miteinander verbunden sind.

40 12. Doppelsträngiges RNA-Molekül nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei einer der beiden RNA-Stränge kodiert wird durch zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent 45 derselben.

13. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Transgene Expressionskassette enthaltend zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent derselben, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in antisense-Orientierung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor funktionell verknüpft ist.
- 15 15. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 13 oder 14, wobei der in Pflanzen funktionelle Promotor ein pathogen-induzierbarer Promotor ist.
16. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15.
17. Transgener Organismus enthaltend ein doppelsträngiges RNA-Moleköl gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 oder einen Vektor gemäß Anspruch 16.
18. Transgener Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen.
- 30 19. Transgener Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
- 40 20. Gewebe, Organ, Teil, Zelle, Zellkultur oder Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 18 oder 19.

1/1

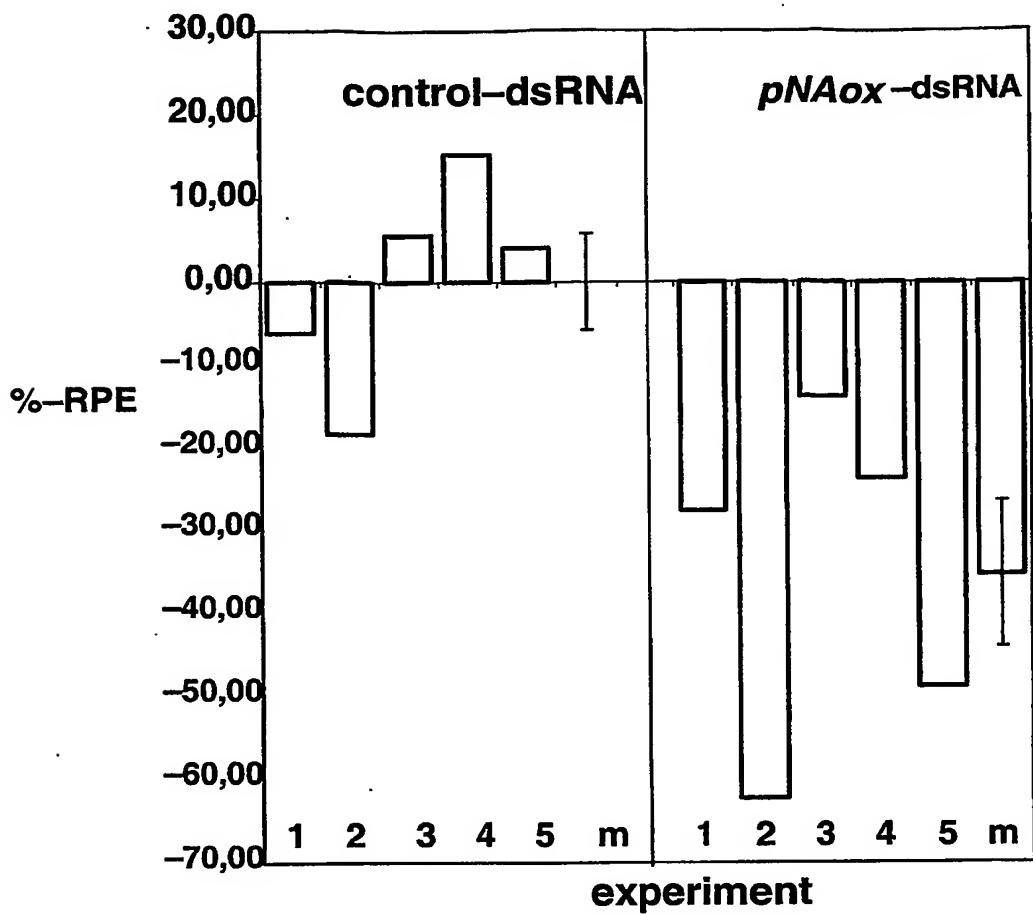


Fig. 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> BASF Plant Science GmbH

<120> Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

<130> AE20020416

<140>

<141>

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 337

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare

<220>

<221> CDS

<222> (2)..(337)

<223> coding for NADPH-oxidase (fragment)

<400> 1.

g ttt aaa gga atc atg aat gag att gct gaa cta gat caa agg aat atc 49
Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ile Ala Glu Leu Asp Gln Arg Asn Ile
1 5 10 15

att gag atg cac aac tat ctc aca agt gtt tat gag gaa ggg gat gct 97
Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala
20 25 30

cgg tca gca ctc atc aca atg ctg caa gct ctc aac cat gcc aag aat 145
Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn
35 40 45

ggt gtc gat gta gtg tct ggm act cga gtc cg^g aca cat ttt gca aga 193
Gly Val Asp Val Val Ser Xaa Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg
50 55 60

cca aat ttt aag agg gtg ctg tct aag gta gcc gcc aaa cat cct tat 241
Pro Asn Phe Lys Arg Val Leu Ser Lys Val Ala Ala Lys His Pro Tyr
65 70 75 80

gcc aag ata gga gtg ttc tat tgc gga gct cca gtt ctg gcg cag gaa 289
Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu
85 90 95

cta agc aac ctt tgc cat gag ttc aat ggc aaa tgc acg aca aaa ttc 337
Leu Ser Asn Leu Cys His Glu Phe Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe
100 105 110

<210> 2

<211> 112.

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare

<400> 2

Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ile Ala Glu Leu Asp Gln Arg Asn Ile
1 5 10 15

Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala
20 25 30

Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn
35 40 45

Gly Val Asp Val Val Ser Xaa Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg
 50 55 60
 Pro Asn Phe Lys Arg Val Leu Ser Lys Val Ala Ala Lys His Pro Tyr
 65 70 75 80
 Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu
 85 90 95
 Leu Ser Asn Leu Cys His Glu Phe Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe
 100 105 110

<210> 3
<211> 2832
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2829)
<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 3

atg	agg	ggc	ggc	gcc	tcc	tcg	gga	ccc	cag	cga	tgg	ggc	tcg	gcg	ggg		48
Met	Arg	Gly	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly	Pro	Gln	Arg	Trp	Gly	Ser	Ala	Gly		
1	5								10					15			

acg	aca	ccg	cg	tcg	ctg	agc	acg	ggc	tcg	tcg	ccg	cgc	ggg	tcc	gac		96
Thr	Thr	Pro	Arg	Ser	Leu	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp		
					20				25					30			

gac	cg	agc	tcc	gac	gac	ggg	gag	gag	ctg	gtc	gag	gtc	acg	ctc	gac		144
Asp	Arg	Ser	Ser	Asp	Asp	Gly	Glu	Glu	Leu	Val	Glu	Val	Thr	Leu	Asp		
					35			40					45				

ctg	cag	gac	gac	acc	att	gtg	ctt	cg	agc	gtc	gag	ccc	g	cg	gg		192
Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr	Ile	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Ala		
					50			55				60					

g	cg	g	cg	g	gg	gt	gg	g	cg	gg	g	cg	g	cg	gg		240
Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Ser	Ala	Arg		
					65			70				75		80			

gg	g	ag	ct	ac	gg	gg	tc	gg		288							
Gly	Glu	Leu	Thr	Gly	Gly	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Ser	Arg		
					85			90				95					

cc	tc	at	cg	ag	ag	tc	tc	ca	cg	ct	ca	t	tc	tc	ca		336
Pro	Ser	Ile	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	His	Arg	Leu	Leu	Gln	Phe	Ser	Gln		
					100			105				110					

g	ct	a	ag	gc	g	ag	gg	at	gc	cg	cg	c	t	tc	tc	ca	384
Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Ala	Met	Ala	Arg	Ala	Arg	Ala	Gln	Phe	Ser	Gln	Asp	
					115			120				125					

ct	ac	a	ag	cg	tt	gg	gc	ag	ca	ag	cg	ca	g	cg	gg		432
Leu	Thr	Lys	Arg	Phe	Gly	Arg	Ser	His	Ser	Arg	Ser	Glu	Ala	Gln	Ala		
					130			135				140					

cc	tc	gg	ct	g	ag	tc	gc	cc	cg	gc	gg	cg	ca	gg	ca		480
Pro	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln		
					145			150				155		160			

cg	cg	c	tc	g	ac	cg	ca	cg	gg	gc	ca	a	ag	cg	ct	cg	528
Arg	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Gly	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Arg		
					165			170				175					

ggc ctc cgc ttc atc agc agc aac aag gcc aac aac gcc tgg atg gag	576
Gly Leu Arg Phe Ile Ser Ser Asn Lys Ala Asn Asn Ala Trp Met Glu	
180 185 190	
gtg cag gcc aac ttc gac cgc ctc gcc cgc gac ggc tac ctc tcc cgc	624
Val Gln Ala Asn Phe Asp Arg Leu Ala Arg Asp Gly Tyr Leu Ser Arg	
195 200 205	
tcc gac ttc gcc gaa tgc atc ggg atg acg gaa tcg aag gag ttc gcg	672
Ser Asp Phe Ala Glu Cys Ile Gly Met Thr Glu Ser Lys Glu Phe Ala	
210 215 220	
ctc gag ctg ttc gac acg ctg agc cgg cga cga cag atg aag gtg gac	720
Leu Glu Leu Phe Asp Thr Leu Ser Arg Arg Arg Gln Met Lys Val Asp	
225 230 235 240	
acg att aac aag gat gaa ctc cgc gag atc tgg cag cag atc acc gat	768
Thr Ile Asn Lys Asp Glu Leu Arg Glu Ile Trp Gln Gln Ile Thr Asp	
245 250 255	
aac agc ttc gac tcc cgt ctc caa atc ttc ttc gaa atg gtg gat aag	816
Asn Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Phe Phe Glu Met Val Asp Lys	
260 265 270	
aac gcg gac ggc cg att acg gag gcg gag gtg aaa gag att att atg	864
Asn Ala Asp Gly Arg Ile Thr Glu Ala Glu Val Lys Glu Ile Ile Met	
275 280 285	
ttg agc gcg tct gcc aat aaa ctg tcg agg ctt aag gag caa gca gaa	912
Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu	
290 295 300	
gag tac gcc gct ttg atc atg gag gag ctt gat cct gaa ggg ctc ggc	960
Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Gly Leu Gly	
305 310 315 320	
tac att gag cta ttg caa ttg gag aca ctt ctg ttg cag aaa gat acc	1008
Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys Asp Thr	
325 330 335	
tat atg aac tat agt cag gcc ctt agt tac aca agc caa gca ctg agc	1056
Tyr Met Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser	
340 345 350	
cag aat ctt gca ggg cta agg aag aag agt tca atc cgc aaa ata agc	1104
Gln Asn Leu Ala Gly Leu Arg Lys Lys Ser Ser Ile Arg Lys Ile Ser	
355 360 365	
acc tct tta agc tac tat ttc gag gac aac tgg aaa cgt tta tgg gtg	1152
Thr Ser Leu Ser Tyr Tyr Phe Glu Asp Asn Trp Lys Arg Leu Trp Val	
370 375 380	
ctt gca ttg tgg att ggg ata atg gct gga ctg ttc acc tgg aaa ttc	1200
Leu Ala Leu Trp Ile Gly Ile Met Ala Gly Leu Phe Thr Trp Lys Phe	
385 390 395 400	
atg cag tat cgt aac cga tat gtc ttt gat gtg atg ggc tac tgt gtc	1248
Met Gln Tyr Arg Asn Arg Tyr Val Phe Asp Val Met Gly Tyr Cys Val	
405 410 415	
aca aca gca aaa gga gct gct gaa acc cta aag ctg aat atg gca att	1296
Thr Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu Asn Met Ala Ile	
420 425 430	
atc ctc ctg cca gta tgc cgt aac acc att act tgg ttg cga agt aca	1344
Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser Thr	
435 440 445	

agg gct gca cgg gca cta cct ttt gat gac aac atc aac ttc cac aag	1392
Arg Ala Ala Arg Ala Ile Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys	
450 455 460	
act att gca gca gca att gtg gtt ggt ata atc ctc cat gca ggg aac	1440
Thr Ile Ala Ala Ala Ile Val Val Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn	
465 470 475 480	
cac ctt gta tgc gat ttt cca cgg tta ata aaa tca tca gat gag aag	1488
His Leu Val Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile Lys Ser Ser Asp Glu Lys	
485 490 495	
tat gct cct ttg ggc cag tat ttt ggg gaa ata aag cca aca tat ttt	1536
Tyr Ala Pro Leu Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Ile Lys Pro Thr Tyr Phe	
500 505 510	
aca ttg gtc aaa gga gtg gag ggc atc act ggg gta atc atg gtt gta	1584
Thr Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Ile Met Val Val	
515 520 525	
tgc atg ata att gct ttt act cta gca acc cgg tgg ttc cgc cgt agc	1632
Cys Met Ile Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Ser	
530 535 540	
ttg gtt aag ctt cca agg cca ttt gac aaa ctg act ggc ttc aat gcc	1680
Leu Val Lys Leu Pro Arg Pro Phe Asp Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala	
545 550 555 560	
ttt tgg tat tct cat cat ctg ttc atc att gtg tat atc gcg ctc att	1728
Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ile Ala Leu Ile	
565 570 575	
gtt cat gga gag tgt cta tac ctt att cat gtc tgg tac aga aga acg	1776
Val His Gly Glu Cys Leu Tyr Leu Ile His Val Trp Tyr Arg Arg Thr	
580 585 590	
aca tgg atg tat ctt tca gtg cct gtt tgc ttg tat gta ggg gag agg	1824
Thr Trp Met Tyr Leu Ser Val Pro Val Cys Leu Tyr Val Gly Glu Arg	
595 600 605	
att cta agg ttc ttc agg tct ggc agt tat tct gtc cgg cta ttg aag	1872
Ile Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys	
610 615 620	
gtg gcc ata tat cca ggt aat gtt ttg aca ctg caa atg tcc aag cct	1920
Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro	
625 630 635 640	
ccc acg ttc cgt tac aag agt gga caa tat atg ttt gtt caa tgt cca	1968
Pro Thr Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro	
645 650 655	
gca gtg tct ccc ttt gaa tgg cat ccc ttc tca att act tca gca cct	2016
Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro	
660 665 670	
ggg gat gac tac ctc agc att cat gtt cga caa ctt ggt gat tgg aca	2064
Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Val Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr	
675 680 685	
cga gaa ctc aag aga gta ttt gct gca gct tgt gag ccc cca gcg ggt	2112
Arg Glu Leu Lys Arg Val Phe Ala Ala Cys Glu Pro Pro Ala Gly	
690 695 700	
ggt aaa agc ggc ctt ctt agg gca gat gag aca act aag aaa atc tta	2160
Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Thr Thr Lys Lys Ile Leu	
705 710 715 720	

ccc aag ctt ctg att gat gga ccg tat ggt tct cct gct cag gat tac 2208
 Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ser Pro Ala Gln Asp Tyr
 725 730 735
 agc aag tat gat gtt tta tta ctt gtt gga tta gga att ggt gcg aca 2256
 Ser Lys Tyr Asp Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
 740 745 750
 ccc ttt att agc ata tta aaa gat ctt ctg aat aac atc atc aaa atg 2304
 Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Ile Lys Met
 755 760 765
 gag gaa gag gag gat gct tct act gat ctt tat cca cca atg ggt cg 2352
 Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Asp Leu Tyr Pro Pro Met Gly Arg
 770 775 780
 aat aag cca cat gtt gat ctg ggc aca ctt atg acg att acc tca aga 2400
 Asn Lys Pro His Val Asp Leu Gly Thr Leu Met Thr Ile Thr Ser Arg
 785 790 795 800
 cca aag aag atc ttg aag acc aca aat gct tac ttt tac tgg gtg aca 2448
 Pro Lys Lys Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr
 805 810 815
 cgt gag caa ggc tct ttt gat tgg ttc aaa gga gtc atg aat gaa att 2496
 Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Ile
 820 825 830
 gct gac ttg gat caa agg aat atc att gag atg cac aac tac cta aca 2544
 Ala Asp Leu Asp Gln Arg Asn Ile Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr
 835 840 845
 agc gtc tat gag gag ggg gat gcc agg tca gca ctc atc acc atg ctc 2592
 Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu
 850 855 860
 caa gct ctg aac cat gcc aag aat gga gtt gat att gtc tct ggg aca 2640
 Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr
 865 870 875 880
 aaa gtc cgg aca cat ttt gca cga cca aat tgg aga aag gtc ctt tct 2688
 Lys Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Leu Ser
 885 890 895
 aaa att tcc tcc aag cat cca tat gcc aaa ata ggt gta ttc tac tgt 2736
 Lys Ile Ser Ser Lys His Pro Tyr Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys
 900 905 910
 gga gct cca gtc ctg gca caa gaa cta agc aaa ctt tgc cat gaa ttc 2784
 Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu Leu Ser Lys Leu Cys His Glu Phe
 915 920 925
 aac ggg aaa tgc aca acg aag ttc gaa ttc cat aag gag cat ttc tga 2832
 Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
 930 935 940
 <210> 4
 <211> 943
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 4
 Met Arg Gly Gly Ala Ser Ser Gly Pro Gln Arg Trp Gly Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Thr Pro Arg Ser Leu Ser Thr Gly Ser Ser Pro Arg Gly Ser Asp
 20 25 30

Asp Arg Ser Ser Asp Asp Gly Glu Glu Leu Val Val Glu Val Thr Leu Asp
35 40 45

Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Val Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala Ala
50 55 60

Ala Ala Ala Ala Gly Val Gly Ala Gly Ala Ala Ser Ala Arg
65 70 75 80

Gly Glu Leu Thr Gly Gly Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ser Arg Ser
85 90 95

Pro Ser Ile Arg Arg Ser Ser His Arg Leu Leu Gln Phe Ser Gln
100 105 110

Glu Leu Lys Ala Glu Ala Met Ala Arg Ala Arg Gln Phe Ser Gln Asp
115 120 125

Leu Thr Lys Arg Phe Gly Arg Ser His Ser Arg Ser Glu Ala Gln Ala
130 135 140

Pro Ser Gly Leu Glu Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Arg Arg Gln
145 150 155 160

Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Gly Ala His Lys Ala Leu Arg
165 170 175

Gly Leu Arg Phe Ile Ser Ser Asn Lys Ala Asn Asn Ala Trp Met Glu
180 185 190

Val Gln Ala Asn Phe Asp Arg Leu Ala Arg Asp Gly Tyr Leu Ser Arg
195 200 205

Ser Asp Phe Ala Glu Cys Ile Gly Met Thr Glu Ser Lys Glu Phe Ala
210 215 220

Leu Glu Leu Phe Asp Thr Leu Ser Arg Arg Arg Gln Met Lys Val Asp
225 230 235 240

Thr Ile Asn Lys Asp Glu Leu Arg Glu Ile Trp Gln Gln Ile Thr Asp
245 250 255

Asn Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Phe Phe Glu Met Val Asp Lys
260 265 270

Asn Ala Asp Gly Arg Ile Thr Glu Ala Glu Val Lys Glu Ile Ile Met
275 280 285

Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu
290 295 300

Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Gly Leu Gly
305 310 315 320

Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys Asp Thr
325 330 335

Tyr Met Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser
340 345 350

Gln Asn Leu Ala Gly Leu Arg Lys Lys Ser Ser Ile Arg Lys Ile Ser
355 360 365

Thr Ser Leu Ser Tyr Tyr Phe Glu Asp Asn Trp Lys Arg Leu Trp Val
370 375 380

Leu Ala Leu Trp Ile Gly Ile Met Ala Gly Leu Phe Thr Trp Lys Phe
385 390 395 400

Met Gln Tyr Arg Asn Arg Tyr Val Phe Asp Val Met Gly Tyr Cys Val
405 410 415

Thr Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu Asn Met Ala Ile
420 425 430

Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser Thr
435 440 445

Arg Ala Ala Arg Ala Leu Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys
450 455 460

Thr Ile Ala Ala Ala Ile Val Val Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn
465 470 475 480

His Leu Val Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile Lys Ser Ser Asp Glu Lys
485 490 495

Tyr Ala Pro Leu Gly Gln Tyr Phe Gly Glu Ile Lys Pro Thr Tyr Phe
500 505 510

Thr Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Ile Met Val Val
515 520 525

Cys Met Ile Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Ser
530 535 540

Leu Val Lys Leu Pro Arg Pro Phe Asp Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala
545 550 555 560

Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ile Ala Leu Ile
565 570 575

Val His Gly Glu Cys Leu Tyr Leu Ile His Val Trp Tyr Arg Arg Thr
580 585 590

Thr Trp Met Tyr Leu Ser Val Pro Val Cys Leu Tyr Val Gly Glu Arg
595 600 605

Ile Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys
610 615 620

Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro
625 630 635 640

Pro Thr Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro
645 650 655

Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro
660 665 670

Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Val Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr
675 680 685

Arg Glu Leu Lys Arg Val Phe Ala Ala Ala Cys Glu Pro Pro Ala Gly
690 695 700

Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Thr Thr Lys Lys Ile Leu
705 710 715 720

Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ser Pro Ala Gln Asp Tyr
725 730 735

Ser Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
740 745 750

Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Ile Lys Met
755 760 765

Glu Glu Glu Asp Ala Ser Thr Asp Leu Tyr Pro Pro Met Gly Arg
770 775 780

Asn Lys Pro His Val Asp Leu Gly Thr Leu Met Thr Ile Thr Ser Arg
785 790 795 800

Pro Lys Lys Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr
 805 810 815

Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Ile
 820 825 830

Ala Asp Leu Asp Gln Arg Asn Ile Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr
 835 840 845

Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu
 850 855 860

Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr
 865 870 875 880

Lys Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Leu Ser
 885 890 895

Lys Ile Ser Ser Lys His Pro Tyr Ala Lys Ile Gly Val Phe Tyr Cys
 900 905 910

Gly Ala Pro Val Leu Ala Gln Glu Leu Ser Lys Leu Cys His Glu Phe
 915 920 925

Asn Gly Lys Cys Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
 930 935 940

<210> 5
<211> 2889
<212> DNA
<213> Nicotiana tabacum

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(2886)
<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 5
atg agg ggt tta cct ggg cat gaa cgc cgg tgg aca tcc gat acg gta 48
Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val
 1 5 10 15

tct tcc gac aag gat ttt agt ggt gaa tta tcg ccg gga gct gat tcc 96
Ser Ser Asp Lys Asp Phe Ser Gly Glu Leu Ser Pro Gly Ala Asp Ser
 20 25 30

ggc tat aat tcc ggt ttt gct tcc gag gag ttt gtt gaa gtc acg ctt 144
Gly Tyr Asn Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Thr Leu
 35 40 45

gat ctt cag gat gat acc att att cta cgg agc gtt gaa ccg gct 192
Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala
 50 55 60

act gtg att aac att gac gct cct gat ctt ccc gcc gga gtc ggt att 240
Thr Val Ile Asn Ile Asp Ala Pro Asp Leu Pro Ala Gly Val Gly Ile
 65 70 75 80

tcc gga gtt tca att gaa act ccg acg tca gca tcg gtg tcg gaa tct 288
Ser Gly Val Ser Ile Glu Thr Pro Thr Ser Ala Ser Val Ser Glu Ser
 85 90 95

cga tcg ccg acg atc cgc cgg agt tca tct agt aaa ctt cgt cag ttt 336
Arg Ser Pro Thr Ile Arg Arg Ser Ser Ser Lys Leu Arg Gln Phe
 100 105 110

tca cag gag ttg aaa gct gag gcg gtt gcg aaa gcg agg cag ttt tca	384
Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Arg Gln Phe Ser	
115 120 125	
caa gag ctg aag gcg gag tta agg aga ttc tca tgg agc cat ggg cat	432
Gln Glu Leu Lys Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ser Trp Ser His Gly His	
130 135 140	
gcg tct cgc gcg ttt tcg ccc tcg tcg ttt ttt caa aac gcc gtc gtt	480
Ala Ser Arg Ala Phe Ser Pro Ser Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val Val	
145 150 155 160	
gga aca ggt aac ggc gtg gac tcg gct tta gcg gca cgt gca tta cgt	528
Gly Thr Gly Asn Gly Val Asp Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu Arg	
165 170 175	
cgg caa cgc gcg cag ctt gat cgg act cgt tcc agc gcc cat aga gct	576
Arg Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala His Arg Ala	
180 185 190	
ctt cgt aga ctc aaa ttc att agc aat aac aaa acc aat gga tgg aat	624
Leu Arg Arg Leu Lys Phe Ile Ser Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp Asn	
195 200 205	
gaa gtt gaa aac aat ttc tca aag ctc gct aaa gac ggt tat ctt tac	672
Glu Val Glu Asn Asn Phe Ser Lys Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu Tyr	
210 215 220	
cgt tcc gat ttc gca caa tgc ata ggt atg aag gat tcg aag gaa ttt	720
Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe	
225 230 235 240	
gca ttg gaa tta ttt gat gct ttg agt aga aga aga aga tta aag gtt	768
Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Arg Arg Arg Arg Leu Lys Val	
245 250 255	
gat aaa att agc aag gag gaa ttg tat gag tac tgg tct caa atc acc	816
Asp Lys Ile Ser Lys Glu Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Thr	
260 265 270	
gat cag agt ttc gat tct cgg ctt cag atc tcc ttc gac atg gtg gac	864
Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Ser Phe Asp Met Val Asp	
275 280 285	
aag aat gaa gat ggt cga att gct gaa gag gaa gta aaa gag atc atc	912
Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile Ala Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile	
290 295 300	
atg cta agt gca tct gca aac aag tta tca aga tta aaa gaa caa gca	960
Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala	
305 310 315 320	
gag gag tat gca gct tta atc atg gaa gaa tta gat cct gaa aga ctc	1008
Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu	
325 330 335	
ggc tac att gag cta tgg cag ctg gaa aca ctt ctc ctc caa aag gac	1056
Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Gln Lys Asp	
340 345 350	
act tac ctc aac tac agt caa gca cta agt tac acg agc caa gcc ttg	1104
Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu	
355 360 365	
agc caa aac ctt cac gga tta agg aag aaa agc cca ata aaa aga atg	1152
Ser Gln Asn Leu His Gly Leu Arg Lys Lys Ser Pro Ile Lys Arg Met	
370 375 380	

agc aca aaa ctt gtc tat tca ttg caa gaa aac tgg aag aga att tgg Ser Thr Lys Leu Val Tyr Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp 385 390 395 400	1200
gtt ctc act tta ttg att ttg ata atg att ggg ctt ttt ctt tgg aag Val Leu Thr Leu Trp Ile Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys 405 410 415	1248
ttc tat cag tac aaa aac aag agt gca ttc cgt gtc atg ggt tat tgc Phe Tyr Gln Tyr Lys Asn Lys Ser Ala Phe Arg Val Met Gly Tyr Cys 420 425 430	1296
ctt gtc acg gct aag ggc gct gct gag act ctc aag ttc aac atg gct Leu Val Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala 435 440 445	1344
ctt ata tta ttg cca gta tgc aga aac act att aca tgg ctc agg tcc Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser 450 455 460	1392
acc aag ttg agc cat ttt gta ccc ttt gac gac aac atc aac ttt cac Thr Lys Leu Ser His Phe Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His 465 470 475 480	1440
aag act gtc gct gca gcc att gtc act ggt atc ata ctc cat gct ggt Lys Thr Val Ala Ala Ala Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His Ala Gly 485 490 495	1488
aac cat ctt gta tgt gat ttc cca agg ctt ata cat gca gat gat caa Asn His Leu Val Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile His Ala Asp Asp Gln 500 505 510	1536
gat tat caa agt ttt ttg tcg aat gat ttt ggc caa agt aag cct gga Asp Tyr Gln Ser Phe Leu Ser Asn Asp Phe Gly Gln Ser Lys Pro Gly 515 520 525	1584
tac ata gac ctt gtt aaa gga gtt gag ggt gtg acg gga ata ata atg Tyr Ile Asp Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Ile Met 530 535 540	1632
gta atc ctt atg gcc att gct ttc act ctt gct aca cga tgg ttt aga Val Ile Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg 545 550 555 560	1680
cgg agc ctc att aag ttg ccc aaa cct ttt gat aga ctc act ggc ttc Arg Ser Leu Ile Lys Leu Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly Phe 565 570 575	1728
aat gca ttc tgg tat tca cac cac ctt gtc att gtc tac atc cta Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Leu Val Ile Val Tyr Ile Leu 580 585 590	1776
ctg atc atc cat ggc acg ttc ctc ttc ctt gtg cat aaa tgg tac tcc Leu Ile Ile His Gly Thr Phe Leu Phe Leu Val His Lys Trp Tyr Ser 595 600 605	1824
aag acg acg tgg atg tat cta gca gtt cct gtg ctt ctc tac gca ggg Lys Thr Thr Trp Met Tyr Leu Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Ala Gly 610 615 620	1872
gaa aga act ctt aga ttc ttc cgg tca ggc ttg tac act gtc cgg ctt Glu Arg Thr Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Thr Val Arg Leu 625 630 635 640	1920
ctg aaa gta gca ata tat cct gga aat gtc ctc act cta caa atg tct Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser 645 650 655	1968

aag cct cct caa ttt cga tac aaa agt gga caa tat atg ttt gtc cag Lys Pro Pro Gln Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln 660 665 670	2016
tgt cca gct gtt tct cca ttc gag tgg cat cca ttt tcc att act tca Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser 675 680 685	2064
gct cct ggg gat gac tac ttg agc att cac atc cgg caa ctt ggt gac Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly Asp 690 695 700	2112
tgg act caa gaa ctc aag cgg gtc ttt tct gag gct tgc gag cgg cca Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu Arg Pro 705 710 715 720	2160
gag gct gga aag agt ggc ctc aga gct gac gaa aac act aag aaa Glu Ala Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr Lys Lys 725 730 735	2208
agt ttg cca aag cta tta ata gat gga cct tac gga gct cca gca caa Ser Leu Pro Lys Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln 740 745 750	2256
gat tac cga aaa tat gat gtc ttg ctg ctt gtt ggt ctt ggc att gga Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly 755 760 765	2304
gca acg ccg ttc ata agt atc ctg aaa gac ttg ctc gtt aac atc gtg Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Val Asn Ile Val 770 775 780	2352
aaa atg gag gag caa gca gat tta gcc tca gat ttc agt ggg aac tca Lys Met Glu Glu Gln Ala Asp Leu Ala Ser Asp Phe Ser Gly Asn Ser 785 790 795 800	2400
gac atg agc gtt gcg aca agt gaa caa cca gct ctc aac aag att tct Asp Met Ser Val Ala Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile Ser 805 810 815	2448
ctg aaa agg aga aag agc act cta aga acc aca aat gca tat ttt tat Leu Lys Arg Arg Lys Ser Thr Leu Arg Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr 820 825 830	2496
tgg gtg acc cgg gag caa gga tca ttt gat tgg ttc aaa ggc gtt atg Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met 835 840 845	2544
aac gaa gtg gct gaa ctt gat caa agg ggg gtc atc gag atg cat aac Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His Asn 850 855 860	2592
tac ttg acg agt gtt tat gag gaa ggg gat gct cgt tca gct ctc att Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile 865 870 875 880	2640
acc atg gtc cag gca ctt aac cat gct aag aat ggg gtt gat att gta Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val 885 890 895	2688
tca ggc acc agg gtg agg aca cat ttt gct agg cca aat tgg aag aaa Ser Gly Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Lys Lys 900 905 910	2736
gta ttt tcc aag acc tta acc aag cat gca aat gca aga ata ggg gtt Val Phe Ser Lys Thr Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly Val 915 920 925	2784

ttc tac tgt ggt gca ccc gta tta gca aaa gaa ctc agc aaa ctc tgc	2832
Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Val Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu Cys	
930 935 940	
aaa gag tat aat caa aag ggt gca aca aag ttc gag ttt cac aaa gaa	2880
Lys Glu Tyr Asn Gln Lys Gly Ala Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu	
945 950 955 960	
cat ttt tag	2889
His Phe	
<210> 6	
<211> 962	
<212> PRT	
<213> Nicotiana tabacum	
<400> 6	
Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val	
1 5 10 15	
Ser Ser Asp Lys Asp Phe Ser Gly Glu Leu Ser Pro Gly Ala Asp Ser	
20 25 30	
Gly Tyr Asn Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Thr Leu	
35 40 45	
Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala	
50 55 60	
Thr Val Ile Asn Ile Asp Ala Pro Asp Leu Pro Ala Gly Val Gly Ile	
65 70 75 80	
Ser Gly Val Ser Ile Glu Thr Pro Thr Ser Ala Ser Val Ser Glu Ser	
85 90 95	
Arg Ser Pro Thr Ile Arg Arg Ser Ser Ser Lys Leu Arg Gln Phe	
100 105 110	
Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Arg Gln Phe Ser	
115 120 125	
Gln Glu Leu Lys Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ser Trp Ser His Gly His	
130 135 140	
Ala Ser Arg Ala Phe Ser Pro Ser Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val Val	
145 150 155 160	
Gly Thr Gly Asn Gly Val Asp Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu Arg	
165 170 175	
Arg Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala His Arg Ala	
180 185 190	
Leu Arg Arg Leu Lys Phe Ile Ser Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp Asn	
195 200 205	
Glu Val Glu Asn Asn Phe Ser Lys Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu Tyr	
210 215 220	
Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe	
225 230 235 240	
Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Arg Arg Arg Arg Leu Lys Val	
245 250 255	
Asp Lys Ile Ser Lys Glu Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Thr	
260 265 270	
Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Ser Phe Asp Met Val Asp	
275 280 285	

Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile Ala Glu Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile
290 295 300

Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala
305 310 315 320

Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu
325 330 335

Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Gln Lys Asp
340 345 350

Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu
355 360 365

Ser Gln Asn Leu His Gly Leu Arg Lys Lys Ser Pro Ile Lys Arg Met
370 375 380

Ser Thr Lys Leu Val Tyr Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp
385 390 395 400

Val Leu Thr Leu Trp Ile Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys
405 410 415

Phe Tyr Gln Tyr Lys Asn Lys Ser Ala Phe Arg Val Met Gly Tyr Cys
420 425 430

Leu Val Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala
435 440 445

Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser
450 455 460

Thr Lys Leu Ser His Phe Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His
465 470 475 480

Lys Thr Val Ala Ala Ala Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His Ala Gly
485 490 495

Asn His Leu Val Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile His Ala Asp Asp Gln
500 505 510

Asp Tyr Gln Ser Phe Leu Ser Asn Asp Phe Gly Gln Ser Lys Pro Gly
515 520 525

Tyr Ile Asp Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Ile Met
530 535 540

Val Ile Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg
545 550 555 560

Arg Ser Leu Ile Lys Leu Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly Phe
565 570 575

Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Leu Val Ile Val Tyr Ile Leu
580 585 590

Leu Ile Ile His Gly Thr Phe Leu Phe Leu Val His Lys Trp Tyr Ser
595 600 605

Lys Thr Thr Trp Met Tyr Leu Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Ala Gly
610 615 620

Glu Arg Thr Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Thr Val Arg Leu
625 630 635 640

Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser
645 650 655

Lys Pro Pro Gln Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln
660 665 670

Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser
 675 680 685

Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly Asp
 690 695 700

Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu Arg Pro
 705 710 715 720

Glu Ala Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr Lys Lys
 725 730 735

Ser Leu Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln
 740 745 750

Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly
 755 760 765

Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Val Asn Ile Val
 770 775 780

Lys Met Glu Glu Gln Ala Asp Leu Ala Ser Asp Phe Ser Gly Asn Ser
 785 790 795 800

Asp Met Ser Val Ala Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile Ser
 805 810 815

Leu Lys Arg Arg Lys Ser Thr Leu Arg Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr
 820 825 830

Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met
 835 840 845

Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His Asn
 850 855 860

Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile
 865 870 875 880

Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val
 885 890 895

Ser Gly Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Lys Lys
 900 905 910

Val Phe Ser Lys Thr Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly Val
 915 920 925

Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Val Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu Cys
 930 935 940

Lys Glu Tyr Asn Gln Lys Gly Ala Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu
 945 950 955 960

His Phe

<210> 7
<211> 3733
<212> DNA
<213> Solanum tuberosum

<220>
<221> CDS
<222> (92)..(2980)
<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 7
ggcacgagaa taaccaaaaac ttttggtcag gcttctgcag aaaactctgt tttcaacata 60

tat	tat	tta	ttgtgctttg	atttgggaca	a	atg	agg	ggt	tta	cct	ggg	cat	112				
						Met	Arg	Gly	Leu	Pro	Gly	His					
						1				5							
gaa	cgc	cg	tgg	acg	tcg	gat	acg	gta	tct	tcc	ggc	aag	gat	tta	agt	160	
Glu	Arg	Arg	Trp	Thr	Ser	Asp	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser		
10								15					20				
ggt	gag	tca	tcg	ccg	gga	act	gat	tcc	ggg	aat	att	tcc	ggt	ttt	gct	208	
Gly	Glu	Ser	Ser	Pro	Gly	Thr	Asp	Ser	Gly	Asn	Ile	Ser	Gly	Phe	Ala		
25								30					35				
tcc	gag	gag	ttt	gtt	gaa	gtt	ata	ctt	gat	ctt	cag	gat	gat	acg		256	
Ser	Glu	Glu	Phe	Val	Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Leu	Gln	Asp	Asp	Asp	Thr		
40							45			50				55			
att	att	cta	cg	agc	gtt	gaa	ccg	gct	act	gta	atc	aac	att	gat	gct	304	
Ile	Ile	Leu	Arg	Ser	Val	Glu	Pro	Ala	Thr	Val	Ile	Asn	Ile	Asp	Ala		
60								65					70				
tct	gat	cct	gct	acc	gga	gtc	ggt	att	ggt	gga	gta	tcg	att	gaa	act	352	
Ser	Asp	Pro	Ala	Thr	Gly	Val	Gly	Ile	Gly	Gly	Val	Ser	Ile	Glu	Thr		
75								80					85				
ccg	g	cg	tc	ct	act	tc	ac	tc	gg	act	cga	tc	cc	ac	at	400	
Pro	Ala	Ser	Leu	Thr	Ser	Thr	Ser	Gly	Thr	Arg	Ser	Pro	Thr	Met	Arg		
90							95					100					
cg	g	ag	tc	aa	tta	cgt	cag	ttt	tca	cag	gag	ttg	aaa	gct		448	
Arg	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Leu	Arg	Gln	Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala		
105							110					115					
gag	g	ct	gtc	g	cg	aa	g	at	ttc	tc	caa	gag	ctt	aa	g	496	
Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Lys	His	Phe	Ser	Gln	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu		
120							125					130			135		
cta	agg	aga	ttc	tca	tgg	agc	cat	gga	cat	g	tc	tct	cg	act	ttt	tc	544
Leu	Arg	Arg	Phe	Ser	Trp	Ser	His	Gly	His	Ala	Ser	Arg	Thr	Phe	Ser		
140								145					150				
ccg	g	cg	tc	tt	tcc	caa	aa	g	cc	gtc	g	tt	aa	g	gt	592	
Pro	Ala	Ser	Phe	Phe	Gln	Asn	Ala	Val	Val	Gly	Thr	Gly	Asn	Gly	Val		
155								160					165				
gat	tc	g	ct	tta	gca	g	ct	cg	cg	cg	g	ct	c	tc		640	
Asp	Ser	Ala	Leu	Ala	Ala	Arg	Ala	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Ala	Gln	Leu		
170								175					180				
gat	cg	act	cgt	tcc	agc	gct	cac	aa	g	ctt	cgt	gga	ctc	aa	tt	688	
Asp	Arg	Thr	Arg	Ser	Ser	Ala	His	Lys	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Lys	Phe		
185								190					195				
atc	agc	aat	aa	act	aa	g	tg	aa	g	tt	g	aa	aa	at	tt	736	
Ile	Ser	Asn	Asn	Lys	Thr	Asn	Gly	Trp	Asn	Glu	Val	Glu	Asn	Asn	Phe		
200								205					210			215	
gct	aa	ct	g	ct	aa	g	ac	gg	tt	at	cgc	tcc	gat	tt	g	784	
Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Asp	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Ser	Asp	Phe	Ala	Gln		
220									225					230			
tgc	atc	gg	at	tg	aa	g	at	tg	aa	tt	tg	aa	tt	tg		832	
Cys	Ile	Gly	Met	Lys	Asp	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala	Leu	Glu	Leu	Phe	Asp		
235									240					245			
gct	tt	tg	ag	tg	aa	tg	aa	tt	tg	aa	tt	tg	tt	tg		880	
Ala	Leu	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Leu	Lys	Val	Asp	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu		
250								255					260				

gaa ttg tat gag tat tgg tct caa atc acc gat cag agt ttc gat tct	928
Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Thr Asp Gln Ser Phe Asp Ser	
265 270 275	
cgg ctt cag atc ttc ttc gac atg gtg gac aag aat gaa gat ggt cga	976
Arg Leu Gln Ile Phe Phe Asp Met Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg	
280 285 290 295	
att ggt gaa gaa gta aaa gag atc atc atg cta agt gcc tct gca	1024
Ile Gly Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala	
300 305 310	
aac aaa tta tca aga tta aaa gaa caa gca gag gag tat gca gct ctg	1072
Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu	
315 320 325	
atc atg gaa gaa tta gat cct gaa aga ctt ggc tac att gag cta tgg	1120
Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp	
330 335 340	
cag ctg gaa acg ctt ctc ctc caa aag gac act tac ctc aac tac agt	1168
Gln Leu Glu Thr Leu Leu Gln Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser	
345 350 355	
caa gca cta agc tac aca agc caa gct ttg agc caa aac ctg caa ggg	1216
Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly	
360 365 370 375	
ttg agg aag aga agc cca ata aga aga atg agc aca aaa ctt gtc tat	1264
Leu Arg Lys Arg Ser Pro Ile Arg Arg Met Ser Thr Lys Leu Val Tyr	
380 385 390	
tca ctg caa gag aat tgg aag aga att tgg gtt ctg gtc ttg tgg att	1312
Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp Val Leu Val Leu Trp Ile	
395 400 405	
ttg ata atg att gga ctt ttt ctt tgg aag ttc tat ctg tac aaa cag	1360
Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys Phe Tyr Leu Tyr Lys Gln	
410 415 420	
aaa agt gca ttt caa gtt atg ggt tat tgc ctt cta aca gct aag ggt	1408
Lys Ser Ala Phe Gln Val Met Gly Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly	
425 430 435	
gct gct gag act cta aag ttc aac atg gct ttg ata ttg ttg cca gtt	1456
Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val	
440 445 450 455	
tgc agg aac acc att aca ttc ctc agg tct act aaa ttg agt tgt ttt	1504
Cys Arg Asn Thr Ile Thr Phe Leu Arg Ser Thr Lys Leu Ser Cys Phe	
460 465 470	
gta ccc ttt gat gac aac atc aac ttc cac aag act gtt gct gca gcc	1552
Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Thr Val Ala Ala Ala	
475 480 485	
att gtt act ggt atc ata ctc cat gcc ggt aat cat ctt gta tgt gat	1600
Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn His Leu Val Cys Asp	
490 495 500	
ttc cca aag ctt ata cat gca aat aat acg aat tat cag aaa tat ttg	1648
Phe Pro Lys Leu Ile His Ala Asn Asn Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr Leu	
505 510 515	
gtg aat gat ttt ggc cca agc cag cct cag tac ata gat ctt gtt aaa	1696
Val Asn Asp Phe Gly Pro Ser Gln Pro Gln Tyr Ile Asp Leu Val Lys	
520 525 530 535	

gga gtg gag ggt gtg aca gga ata ata atg gta atc ctc atg gcc att Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Ile Met Val Ile Leu Met Ala Ile 540 545 550	1744
gct ttc act ctt gca acg cga tgg ttt agg cg ^g agc ctc att aag ttt Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Ser Leu Ile Lys Phe 555 560 565	1792
ccc aaa cct ttt gat aga ctc act ggt ttc aat gc ^g ttc tgg tac tcg Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser 570 575 580	1840
cac cac ctt ctc atc att gtc tac atc gta ctg atc atc cat ggc aca His His Leu Leu Ile Ile Val Tyr Ile Val Leu Ile Ile His Gly Thr 585 590 595	1888
ttc ctc tac ctt gtg cat aac tgg tac tcc aaa acg aca tgg atg tat Phe Leu Tyr Leu Val His Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Thr Trp Met Tyr 600 605 610 615	1936
cta gca gtt cct gta ctt ctc tac gca ggg gaa aga act ctt aga ttc Leu Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Thr Leu Arg Phe 620 625 630	1984
ttc cga tca ggc tta tat aca gtc cgg ctt cta aaa gta gca ata tat Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Thr Val Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr 635 640 645	2032
cct gga aat gtc ctt act ctg caa atg tct aag cct cc ^g caa ttt cga Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro Pro Gln Phe Arg 650 655 660	2080
tac aag agt gga caa tat atg ttt gtc cag tgt cca gct gtt tct cca Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro 665 670 675	2128
ttc gag tgg cat cca ttt tcc att act tca gct cct ggg gat gac tac Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr 680 685 690 695	2176
ttg agc att cat atc cga caa ctt ggt gac tgg act caa gaa ctc aag Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys 700 705 710	2224
cg ^g gtg ttt tcc gag gct tgc gag cag cca gag gct gga aag agt ggc Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu Gln Pro Glu Ala Gly Lys Ser Gly 715 720 725	2272
ctg ctc aga gct gac gaa aac acc aaa aca agt ttg cca aag cta ttg Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr Lys Thr Ser Leu Pro Lys Leu Leu 730 735 740	2320
ata gat gga cct tat gga gct cca gca caa gat tac cga aag tat gat Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp 745 750 755	2368
gtc tta ctg ctt gtt ggt ctt ggc att gga gca act ccc ttt ata agt Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser 760 765 770 775	2416
atc ctg aaa gac ttg ctc aaa aac atc gtc aca atg gag gag caa gca Ile Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asn Ile Val Thr Met Glu Glu Gln Ala 780 785 790	2464
gat tta gtc tcg gat ttt tca ggg aac tca gac atg agc gct gca aca Asp Leu Val Ser Asp Phe Ser Gly Asn Ser Asp Met Ser Ala Ala Thr 795 800 805	2512

agt gaa caa cca gct ctc aac aag att tct cca aaa aag aga aag agt	2560
Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile Ser Pro Lys Lys Arg Lys Ser	
810 815 820	
act cta aaa acc aca aat gca tat ttt tat tgg gtg acc cgg gag caa	2608
Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln	
825 830 835	
gga tca ttt gat tgg ttc aaa ggt gtt atg aac gaa gtg gct gaa ctt	2656
Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Val Ala Glu Leu	
840 845 850 855	
gat caa agg ggg gtc atc gag atg cat aac tac tta acg agt gtt tat	2704
Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr	
860 865 870	
gag gaa ggg gat gca cgt tca gct ctc att acc atg gtc cag gcg ctt	2752
Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Val Gln Ala Leu	
875 880 885	
aac cat gct aag aat ggg gtt gat att gta tca ggc acc agt gtg agg	2800
Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr Ser Val Arg	
890 895 900	
aca cat ttt gcc aga ccg aat tgg agg aaa gta ttt tcc aag acc tta	2848
Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Phe Ser Lys Thr Leu	
905 910 915	
acc aag cat gca aat gca aga ata gga gtt ttc tac tgc ggt gca ccc	2896
Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro	
920 925 930 935	
ata tta gct aaa gaa ctc agc aaa ctc tgc aaa gag ttt aac caa aag	2944
Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu Cys Lys Glu Phe Asn Gln Lys	
940 945 950	
ggc aca acg aag ttc gag ttt cac aaa gaa cat ttt tagaaggccc	2990
Gly Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe	
955 960	
tggagtacaa ttaatcttgc atcaacggta cacacatcg taaaaccagta ttaccat 3050	
ctatcttgg tacctgattt gatgattcta ctgaagacat aacattagta aggaataagt 3110	
cagagacaaa ttgtacataa taggaggaag cacattaca gagaaaatac ataccaatat 3170	
gatatgtgta taggtttgtt atattcagtc atctgttatac acataccaaa cttcagaact 3230	
ccaaaaggaa gactctgctt tggtctgatg gcttagaata tgggaggaa aaaaagacga 3290	
caattgaatg gtcacgatac acatgaagaa tgagaatatt gggaaacagc taataagaag 3350	
ttgaccttct tgataaagaa acactatgaa aatggcaagc atgaaaggac agacaatcat 3410	
ggcttggatg gggaaaacaa aatacaattt tgaaagaaga agataatatt agtaggagta 3470	
gtgggggact gatagcttg ttgggtgaac ttataatggg gctaaggaa tccttccaaa 3530	
aaatgtctat gtagtaacta cttttcttt tgcttgtga gtatTTTtggatTTTta 3590	
atatactact tattagataa gaggatagaa aatacgtgta tatgcaattc ttattagtaa 3650	
agtttatctg tagtagttct ttaatctgga gaaaggtact atcaaaggaa atatctcatc 3710	
aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa aaa	3733

<210> 8

<211> 963

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 8
Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val
1 5 10 15
Ser Ser Gly Lys Asp Leu Ser Gly Glu Ser Ser Pro Gly Thr Asp Ser
20 25 30
Gly Asn Ile Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Ile Leu
35 40 45
Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala
50 55 60
Thr Val Ile Asn Ile Asp Ala Ser Asp Pro Ala Thr Gly Val Gly Ile
65 70 75 80
Gly Gly Val Ser Ile Glu Thr Pro Ala Ser Leu Thr Ser Thr Ser Gly
85 90 95
Thr Arg Ser Pro Thr Met Arg Arg Ser Thr Ser Asn Lys Leu Arg Gln
100 105 110
Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Lys His Phe
115 120 125
Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ser Trp Ser His Gly
130 135 140
His Ala Ser Arg Thr Phe Ser Pro Ala Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val
145 150 155 160
Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Asp Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu
165 170 175
Arg Arg Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala His Lys
180 185 190
Ala Leu Arg Gly Leu Lys Phe Ile Ser Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp
195 200 205
Asn Glu Val Glu Asn Asn Phe Ala Lys Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu
210 215 220
Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu
225 230 235 240
Phe Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Arg Arg Arg Arg Leu Lys
245 250 255
Val Asp Lys Ile Ser Lys Glu Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile
260 265 270
Thr Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Phe Phe Asp Met Val
275 280 285
Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile Gly Glu Glu Val Lys Glu Ile
290 295 300
Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln
305 310 315 320
Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg
325 330 335
Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys
340 345 350
Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala
355 360 365

Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly Leu Arg Lys Arg Ser Pro Ile Arg Arg
 370 375 380
 Met Ser Thr Lys Leu Val Tyr Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile
 385 390 395 400
 Trp Val Leu Val Leu Trp Ile Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp
 405 410 415
 Lys Phe Tyr Leu Tyr Lys Gln Lys Ser Ala Phe Gln Val Met Gly Tyr
 420 425 430
 Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met
 435 440 445
 Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Phe Leu Arg
 450 455 460
 Ser Thr Lys Leu Ser Cys Phe Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe
 465 470 475 480
 His Lys Thr Val Ala Ala Ala Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His Ala
 485 490 495
 Gly Asn His Leu Val Cys Asp Phe Pro Lys Leu Ile His Ala Asn Asn
 500 505 510
 Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr Leu Val Asn Asp Phe Gly Pro Ser Gln Pro
 515 520 525
 Gln Tyr Ile Asp Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Ile
 530 535 540
 Met Val Ile Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe
 545 550 555 560
 Arg Arg Ser Leu Ile Lys Phe Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly
 565 570 575
 Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Leu Ile Ile Val Tyr Ile
 580 585 590
 Val Leu Ile Ile His Gly Thr Phe Leu Tyr Leu Val His Asn Trp Tyr
 595 600 605
 Ser Lys Thr Thr Trp Met Tyr Leu Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Ala
 610 615 620
 Gly Glu Arg Thr Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Thr Val Arg
 625 630 635 640
 Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met
 645 650 655
 Ser Lys Pro Pro Gln Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val
 660 665 670
 Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr
 675 680 685
 Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly
 690 695 700
 Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu Gln
 705 710 715 720
 Pro Glu Ala Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr Lys
 725 730 735
 Thr Ser Leu Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala
 740 745 750

Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile
 755 760 765
 Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asn Ile
 770 775 780
 Val Thr Met Glu Glu Gln Ala Asp Leu Val Ser Asp Phe Ser Gly Asn
 785 790 795 800
 Ser Asp Met Ser Ala Ala Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile
 805 810 815
 Ser Pro Lys Lys Arg Lys Ser Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe
 820 825 830
 Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val
 835 840 845
 Met Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His
 850 855 860
 Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu
 865 870 875 880
 Ile Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile
 885 890 895
 Val Ser Gly Thr Ser Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg
 900 905 910
 Lys Val Phe Ser Lys Thr Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly
 915 920 925
 Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Lys Leu
 930 935 940
 Cys Lys Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys
 945 950 955 960
 Glu His Phe

<210> 9
 <211> 3316
 <212> DNA
 <213> Lycopersicon esculentum
 <220>
 <221> CDS
 <222> (146)..(3112)
 <223> coding for NADPH-oxidase
 <400> 9
 cgccactcgt gccgaattcg gcacgaggct ctgaaaaact tttcatacaa agccaatcta 60
 tttctctctc tttctttgg tcaggcttct acagaaaact ctgtttcaa cgtatattta 120
 ttatgtca ttgatgg gacag atg agg ggt tta cct ggg cat gaa cgc 172
 Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg
 1 5
 cgg tgg acg tcg gat acg gtg tct tcc ggg aag gat tta agt ggt gag 220
 Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val Ser Ser Gly Lys Asp Leu Ser Gly Glu
 10 15 20 25
 tca tcg ccg gga act gat tcc ggg aat att tcc ggt ttt gct tcg gag 268
 Ser Ser Pro Gly Thr Asp Ser Gly Asn Ile Ser Gly Phe Ala Ser Glu
 30 35 40

gag ttt gtt gaa gtt ata ctt gat ctt cag gat gat gat acg att att		316	
Glu Phe Val Glu Val Ile Leu Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile			
45	50	55	
tta cg ^g agc gtt gaa ccg gct act gta atc aac att gat ggt tct gat		364	
Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala Thr Val Ile Asn Ile Asp Gly Ser Asp			
60	65	70	
cct gct tcc gga gtc ggt att ggt gga gca tcg att gaa act ccg gcg		412	
Pro Ala Ser Gly Val Gly Ile Gly Ala Ser Ile Glu Thr Pro Ala			
75	80	85	
tcg gtg acg tcg acg tcg gaa act cga tcg ccg atg atg cgt ccg agt		460	
Ser Val Thr Ser Thr Ser Glu Thr Arg Ser Pro Met Met Arg Arg Ser			
90	95	100	105
aca tct aat aag ttt cgt cag ttt tca cag gag ttg aaa gct gag gct		508	
Thr Ser Asn Lys Phe Arg Gln Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala			
110	115	120	
gtt gcg aaa gcg aag cat ttc tcg caa gag ctt aaa gcg gag cta agg		556	
Val Ala Lys Ala Lys His Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Leu Arg			
125	130	135	
aga ttc tca tgg agc cat gga cat gcg tct cgt gct ttt tcg ccg gcg		604	
Arg Phe Ser Trp Ser His Gly His Ala Ser Arg Ala Phe Ser Pro Ala			
140	145	150	
tcg ttt ttc caa aac gct gtc gtc gga aca ggc aac ggt gta gac tcg		652	
Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Asp Ser			
155	160	165	
gct tta gcg gct cga gca tta cgt cgg cag cgt gct cag ctc gac ccg		700	
Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu Arg Arg Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg			
170	175	180	185
act cgt tcc agc gca cac aag gct ctt cgt gga ctc aaa ttc atc agc		748	
Thr Arg Ser Ser Ala His Lys Ala Leu Arg Gly Leu Lys Phe Ile Ser			
190	195	200	
aat aac aaa act aac gga tgg aat gaa gtt gaa aac aat ttc gct aag		796	
Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp Asn Glu Val Glu Asn Asn Phe Ala Lys			
205	210	215	
ctc gct aaa gac ggt tac ctt tat cgt tcc gat ttc gca caa tgc atc		844	
Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile			
220	225	230	
ggt cag tac tca cgc cgg cga tca cta cag ttt aat tat aga tta att		892	
Gly Gln Tyr Ser Arg Arg Ser Leu Gln Phe Asn Tyr Arg Leu Ile			
235	240	245	
aca tta att ttg att aat tat ttg gtt aaa ggt atg aag gat tca aag		940	
Thr Leu Ile Leu Ile Asn Tyr Leu Val Lys Gly Met Lys Asp Ser Lys			
250	255	260	265
gaa ttt gcg ttg gaa ttg ttt gat gct tta agt aga aga aga ttg		988	
Glu Phe Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Arg Arg Arg Leu			
270	275	280	
aag gtt gat aag att agc caa gag gaa ttg tat gag tat tgg tct caa		1036	
Lys Val Asp Lys Ile Ser Gln Glu Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln			
285	290	295	
atc acc gat cag agt ttc gat tct cgg ctt cag atc ttc ttc gac atg		1084	
Ile Thr Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Phe Phe Asp Met			
300	305	310	

gtg gac aag aat gaa gat ggt cga att ggt gaa gaa gaa gta aaa gag		1132
Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile Gly Glu Glu Val Lys Glu		
315 320 325		
atc atc atg cta agt gcc tct gca aac aaa tta tca aga tta aaa gaa		1180
Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu		
330 335 340 345		
caa gca gag gag tat gca gct ctg atc atg gaa gaa tta gat cct gaa		1228
Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu		
350 355 360		
aga ctt ggc tac att gag cta tgg cag ctg gaa aca ctt ctc ctc caa		1276
Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Gln		
365 370 375		
aag gac act tac ctc aac tac agt caa gca cta agc tac aca agc caa		1324
Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln		
380 385 390		
gct ttg agc caa aat ctg caa ggg ttg agg aag aga agc cca ata aga		1372
Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly Leu Arg Lys Arg Ser Pro Ile Arg		
395 400 405		
aga atg agc aca aaa ctt gtc tat tca ctg caa gag aat tgg aag aga		1420
Arg Met Ser Thr Lys Leu Val Tyr Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg		
410 415 420 425		
att tgg gtt ctg gtc ttg tgg att ttg ata atg att gga ctt ttt ctt		1468
Ile Trp Val Leu Val Leu Trp Ile Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu		
430 435 440		
tgg aag ttc tat cag tac aaa cag aaa agt gca ttt caa gtc atg ggt		1516
Trp Lys Phe Tyr Gln Tyr Lys Gln Lys Ser Ala Phe Gln Val Met Gly		
445 450 455		
tat tgc ctt cta aca gct aag ggt gct gct gag act ctc aag ttc aac		1564
Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn		
460 465 470		
atg gct tta ata ttg ttg cca gta tgc agg aac acc att aca ttc ctc		1612
Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Phe Leu		
475 480 485		
agg tct act aaa ttg agc tgt ttt gta ccc ttt gat gac aac ata aac		1660
Arg Ser Thr Lys Leu Ser Cys Phe Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn		
490 495 500 505		
ttt cac aag act gtt gct gca gcc att gtc act ggt atc ata ctc cat		1708
Phe His Lys Thr Val Ala Ala Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His		
510 515 520		
gcc ggt aat cac ctt gta tgt gat ttc cca aag ctt ata cat gca aat		1756
Ala Gly Asn His Leu Val Cys Asp Phe Pro Lys Leu Ile His Ala Asn		
525 530 535		
agt acg aat tat cag aaa tat ttg gtg aat gat ttt ggc cca agc cag		1804
Ser Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr Leu Val Asn Asp Phe Gly Pro Ser Gln		
540 545 550		
cct cag tac ata gat ctt gtt aaa gga gtg gag ggt gtg act gga ata		1852
Pro Gln Tyr Ile Asp Leu Val Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile		
555 560 565		
gtt atg gta atc ctc atg gcc att gct ttc act ctt gca acg cga tgg		1900
Val Met Val Ile Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp		
570 575 580 585		

ttt agg cgg agc ctc att aag tta ccc aaa cct ttt gat aga ctc act	1948
Phe Arg Arg Ser Leu Ile Lys Leu Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr	
590 595 600	
ggt ttc aat gcg ttc tgg tac tcg cac cac ctt ctc atc att gtc tac	1996
Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Leu Ile Ile Val Tyr	
605 610 615	
atc gta ctg atc atc cat ggc aca ttc ctc tac ctt gtg cat aac tgg	2044
Ile Val Leu Ile Ile His Gly Thr Phe Leu Tyr Leu Val His Asn Trp	
620 625 630	
tac tcc aaa acg aca tgg atg tat ata gca gtt cct gta ctt ctt tac	2092
Tyr Ser Lys Thr Trp Met Tyr Ile Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr	
635 640 645	
gca ggg gaa aga act ctt aga ttc ttc cga tca ggc tta tac agt gtc	2140
Ala Gly Glu Arg Thr Leu Arg Phe Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Ser Val	
650 655 660 665	
cgg ctt cta aaa gta gca ata tat cct gga aat gtc ctt act ctg caa	2188
Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln	
670 675 680	
atg tct aag cct ccg caa ttt cga tac aag agt gga cag tat atg ttt	2236
Met Ser Lys Pro Pro Gln Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe	
685 690 695	
gtc cag tgt cca gct gtt tct cca ttc gag tgg cat cca ttt tcc att	2284
Val Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile	
700 705 710	
act tca gct cct ggg gat gac tac ttg agc att cat atc cga caa ctt	2332
Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu	
715 720 725	
ggt gac tgg act caa gaa ctc aag cga gtg ttt tcc gag gct tgc gag	2380
Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu	
730 735 740 745	
cag cca gag gct gga aag agt ggc ctg ctc aga gct gac gaa aac acc	2428
Gln Pro Glu Ala Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr	
750 755 760	
aaa aca agt ttg cca aag cta tta ata gat gga cct tat gga gct cca	2476
Lys Thr Ser Leu Pro Lys Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro	
765 770 775	
gca caa gat tac cgg aag tat gat gtc tta ctg ctt gtt ggt ctt ggc	2524
Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Val Gly Leu Gly	
780 785 790	
att gga gca act ccc ttt ata agt atc ctg aaa gac ttg ctc aaa aac	2572
Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asn	
795 800 805	
atc gtc gca atg gag gag caa gca gat tta gtc tcg gat ttc agt gga	2620
Ile Val Ala Met Glu Glu Gln Ala Asp Leu Val Ser Asp Phe Ser Gly	
810 815 820 825	
aac tcg gac atg agt gct gca aca agt gaa caa cca gct ctc aac aag	2668
Asn Ser Asp Met Ser Ala Ala Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys	
830 835 840	
att tct cca aaa aag aga aag agt act cta aaa acc aca aat gca tat	2716
Ile Ser Pro Lys Lys Arg Lys Ser Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr	
845 850 855	

ttt tat tgg gtg acc cgg gag caa gga tca ttt gat tgg ttc aaa ggt Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly 860 865 870	2764
gtt atg aat gaa gtg gct gaa ctt gat caa agg ggt gtc atc gag atg Val Met Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met 875 880 885	2812
cat aac tac ttg acg agt gtt tat gag gaa ggg gat gca cgt tca gct His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala 890 895 900 905	2860
ctc att acc atg gtc cag gca ctt aac cat gct aag aat ggg gtt gat Leu Ile Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp 910 915 920	2908
att gta tca ggc acc agt gtg agg aca cat ttc gcc agg ccg aat tgg Ile Val Ser Gly Thr Ser Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp 925 930 935	2956
agg aaa gta ttt tcc aag acc tta acc aag cat gca aat gca aga ata Arg Lys Val Phe Ser Lys Thr Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile 940 945 950	3004
gga gtt ttc tac tgt ggt gca ccc ata tta gct aaa gaa ctc agc caa Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Gln 955 960 965	3052
ctc tgc aaa gag ttt aac caa aag ggc aca aca aag ttc gag ttt cac Leu Cys Lys Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Thr Lys Phe Glu Phe His 970 975 980 985	3100
aaa gaa cat ttt tagaaggccc tggagtatga ttaatcttgc atcaacggta Lys Glu His Phe	3152
cacacatcta tcttcggcac cttatttgat tattctactg aagagataac attagtaagg aataagtcaag agataaaattg tacataatag ggaagaagac tatttcaaga gaaaatacat accaataaga tgtaaaaaaaaaaaaaaa aaaaactcgt gccc	3212 3272 3316
<210> 10	
<211> 989	
<212> PRT	
<213> Lycopersicon esculentum	
<400> 10	
Met Arg Gly Leu Pro Gly His Glu Arg Arg Trp Thr Ser Asp Thr Val 1 5 10 15	
Ser Ser Gly Lys Asp Leu Ser Gly Glu Ser Ser Pro Gly Thr Asp Ser 20 25 30	
Gly Asn Ile Ser Gly Phe Ala Ser Glu Glu Phe Val Glu Val Ile Leu 35 40 45	
Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Ile Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala 50 55 60	
Thr Val Ile Asn Ile Asp Gly Ser Asp Pro Ala Ser Gly Val Gly Ile 65 70 75 80	
Gly Gly Ala Ser Ile Glu Thr Pro Ala Ser Val Thr Ser Thr Ser Glu 85 90 95	
Thr Arg Ser Pro Met Met Arg Arg Ser Thr Ser Asn Lys Phe Arg Gln 100 105 110	
Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Lys His Phe 115 120 125	

Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Leu Arg Arg Phe Ser Trp Ser His Gly
 130 135 140
 His Ala Ser Arg Ala Phe Ser Pro Ala Ser Phe Phe Gln Asn Ala Val
 145 150 155 160
 Val Gly Thr Gly Asn Gly Val Asp Ser Ala Leu Ala Ala Arg Ala Leu
 165 170 175
 Arg Arg Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala His Lys
 180 185 190
 Ala Leu Arg Gly Leu Lys Phe Ile Ser Asn Asn Lys Thr Asn Gly Trp
 195 200 205
 Asn Glu Val Glu Asn Asn Phe Ala Lys Leu Ala Lys Asp Gly Tyr Leu
 210 215 220
 Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile Gly Gln Tyr Ser Arg Arg Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Gln Phe Asn Tyr Arg Leu Ile Thr Leu Ile Leu Ile Asn Tyr
 245 250 255
 Leu Val Lys Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe Ala Leu Glu Leu Phe
 260 265 270
 Asp Ala Leu Ser Arg Arg Arg Leu Lys Val Asp Lys Ile Ser Gln
 275 280 285
 Glu Glu Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Thr Asp Gln Ser Phe Asp
 290 295 300
 Ser Arg Leu Gln Ile Phe Phe Asp Met Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly
 305 310 315 320
 Arg Ile Gly Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser
 325 330 335
 Ala Asn Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala
 340 345 350
 Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu
 355 360 365
 Trp Gln Leu Glu Thr Leu Leu Gln Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr
 370 375 380
 Ser Gln Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln
 385 390 395 400
 Gly Leu Arg Lys Arg Ser Pro Ile Arg Arg Met Ser Thr Lys Leu Val
 405 410 415
 Tyr Ser Leu Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp Val Leu Val Leu Trp
 420 425 430
 Ile Leu Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys Phe Tyr Gln Tyr Lys
 435 440 445
 Gln Lys Ser Ala Phe Gln Val Met Gly Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys
 450 455 460
 Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro
 465 470 475 480
 Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Phe Leu Arg Ser Thr Lys Leu Ser Cys
 485 490 495
 Phe Val Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Thr Val Ala Ala
 500 505 510

Ala Ile Val Thr Gly Ile Ile Leu His Ala Gly Asn His Leu Val Cys
 515 520 525
 Asp Phe Pro Lys Leu Ile His Ala Asn Ser Thr Asn Tyr Gln Lys Tyr
 530 535 540
 Leu Val Asn Asp Phe Gly Pro Ser Gln Pro Gln Tyr Ile Asp Leu Val
 545 550 555 560
 Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Val Met Val Ile Leu Met Ala
 565 570 575
 Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Ser Leu Ile Lys
 580 585 590
 Leu Pro Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr
 595 600 605
 Ser His His Leu Leu Ile Ile Val Tyr Ile Val Leu Ile Ile His Gly
 610 615 620
 Thr Phe Leu Tyr Leu Val His Asn Trp Tyr Ser Lys Thr Thr Trp Met
 625 630 635 640
 Tyr Ile Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Thr Leu Arg
 645 650 655
 Phe Phe Arg Ser Gly Leu Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile
 660 665 670
 Tyr Pro Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro Pro Gln Phe
 675 680 685
 Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro Ala Val Ser
 690 695 700
 Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp
 705 710 715 720
 Tyr Leu Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu
 725 730 735
 Lys Arg Val Phe Ser Glu Ala Cys Glu Gln Pro Glu Ala Gly Lys Ser
 740 745 750
 Gly Leu Leu Arg Ala Asp Glu Asn Thr Lys Thr Ser Leu Pro Lys Leu
 755 760 765
 Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr
 770 775 780
 Asp Val Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile
 785 790 795 800
 Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Lys Asn Ile Val Ala Met Glu Glu Gln
 805 810 815
 Ala Asp Leu Val Ser Asp Phe Ser Gly Asn Ser Asp Met Ser Ala Ala
 820 825 830
 Thr Ser Glu Gln Pro Ala Leu Asn Lys Ile Ser Pro Lys Lys Arg Lys
 835 840 845
 Ser Thr Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu
 850 855 860
 Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu Val Ala Glu
 865 870 875 880
 Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val
 885 890 895

Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Val Gln Ala
 900 905 910
 Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr Ser Val
 915 920 925
 Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Phe Ser Lys Thr
 930 935 940
 Leu Thr Lys His Ala Asn Ala Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala
 945 950 955 960
 Pro Ile Leu Ala Lys Glu Leu Ser Gln Leu Cys Lys Glu Phe Asn Gln
 965 970 975
 Lys Gly Thr Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
 980 985

<210> 11
<211> 3080
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> CDS
<222> (15)..(2846)
<223> coding for NADPH-oxidase
<400> 11
ccgactttgg atct atg aaa ccg ttc tca aag aac gat cgg cga cgg tgg 50
Met Lys Pro Phe Ser Lys Asn Asp Arg Arg Arg Trp
1 5 10
tca ttt gat tca gtt tcc gcc gga aaa acc gcc gtc gga agt gca tca 98
Ser Phe Asp Ser Val Ser Ala Gly Lys Thr Ala Val Gly Ser Ala Ser
15 20 25
act tca ccg gga act gaa tac tcc att aac ggt gat caa gag ttc gtt 146
Thr Ser Pro Gly Thr Glu Tyr Ser Ile Asn Gly Asp Gln Glu Phe Val
30 35 40
gaa gtc aca atc gat cttcaa gac gat gac aca atc gtt ctt cgt agc 194
Glu Val Thr Ile Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Val Leu Arg Ser
45 50 55 60
gtc gag cca gca acc gcc att aat gtc atc gga gat atc tcc gac gac 242
Val Glu Pro Ala Thr Ala Ile Asn Val Ile Gly Asp Ile Ser Asp Asp
65 70 75
aac acc gga ata atg act ccg gtt tcg att tcg aga tct ccg acg atg 290
Asn Thr Gly Ile Met Thr Pro Val Ser Ile Ser Arg Ser Pro Thr Met
80 85 90
aaa cga act tca tct aat ccg ttc cga caa ttc tca caa gag ctt aaa 338
Lys Arg Thr Ser Ser Asn Arg Phe Arg Gln Phe Ser Gln Glu Leu Lys
95 100 105
gcc gaa gct gtg gcg aaa gcg aaa cag tta tct cag gag ttg aaa cga 386
Ala Glu Ala Val Ala Lys Ala Lys Gln Leu Ser Gln Glu Leu Lys Arg
110 115 120
ttc tca tgg tct cgt tct ttc tca ggt aac tta acc act act agt acc 434
Phe Ser Trp Ser Arg Ser Phe Ser Gly Asn Leu Thr Thr Ser Thr
125 130 135 140
gcc gct aat caa agc ggc ggt gct ggt ggt ggt ttg gtg aac tcg gct 482
Ala Ala Asn Gln Ser Gly Gly Ala Gly Gly Gly Leu Val Asn Ser Ala
145 150 155

tta gaa gcg cga gcg ttg cga aag caa cgt gct cag tta gat cgg act	530
Leu Glu Ala Arg Ala Leu Arg Lys Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr	
160 165 170	
cgg tct agt gct caa aga gct ctt cgt ggt ttg aga ttc att agc aat	578
Arg Ser Ser Ala Gln Arg Ala Leu Arg Gly Leu Arg Phe Ile Ser Asn	
175 180 185	
aag caa aag aac gtt gat ggt tgg aac gat gtt caa tca aat ttc gaa	626
Lys Gln Lys Asn Val Asp Gly Trp Asn Asp Val Gln Ser Asn Phe Glu	
190 195 200	
aaa ttc gaa aaa aat ggt tac atc tat cgc tcc gat ttc gct caa tgc	674
Lys Phe Glu Lys Asn Gly Tyr Ile Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys	
205 210 215 220	
ata gga atg aaa gat tcg aaa gaa ttt gca ttg gaa ctg ttc gat gca	722
Ile Gly Met Lys Asp Ser Lys Glu Phe Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala	
225 230 235	
ttg agt aga aga aga tta aaa gta gag aaa atc aat cac gat gag	770
Leu Ser Arg Arg Arg Leu Lys Val Glu Lys Ile Asn His Asp Glu	
240 245 250	
ctt tat gag tat tgg tca caa atc aac gac gag agt ttt gat tct cgt	818
Leu Tyr Glu Tyr Trp Ser Gln Ile Asn Asp Glu Ser Phe Asp Ser Arg	
255 260 265	
ctc cag atc ttc ttc gac ata gtg gac aag aat gaa gat ggg aga att	866
Leu Gln Ile Phe Phe Asp Ile Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile	
270 275 280	
aca gaa gag gaa gta aaa gag ata ata atg ttg agt gca tct gca aat	914
Thr Glu Glu Glu Val Lys Glu Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn	
285 290 295 300	
aag cta tca aga tta aag gaa caa gca gag gaa tat gca gct ttg att	962
Lys Leu Ser Arg Leu Lys Glu Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile	
305 310 315	
atg gaa gag tta gat cct gaa aga ctt ggc tac ata gag cta tgg caa	1010
Met Glu Glu Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln	
320 325 330	
cta gag act ttg ctt cta caa aaa gac aca tac ctc aat tac agt caa	1058
Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln	
335 340 345	
gca ttg agc tat acg agc caa gca ttg agc caa aac ctt caa ggg tta	1106
Ala Leu Ser Tyr Thr Ser Gln Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly Leu	
350 355 360	
agg gga aag agt cga ata cat aga atg agt tcg gat ttc gtc tac att	1154
Arg Gly Lys Ser Arg Ile His Arg Met Ser Ser Asp Phe Val Tyr Ile	
365 370 375 380	
atg caa gag aat tgg aaa agg ata tgg gtt tta tcc tta tgg atc atg	1202
Met Gln Glu Asn Trp Lys Arg Ile Trp Val Leu Ser Leu Trp Ile Met	
385 390 395	
atc atg atc gga tta ttc ttg tgg aaa ttc ttc caa tac aag caa aaa	1250
Ile Met Ile Gly Leu Phe Leu Trp Lys Phe Phe Gln Tyr Lys Gln Lys	
400 405 410	
gat gca ttt cat gtg atg gga tat tgt tta ctc aca gcc aaa gga gca	1298
Asp Ala Phe His Val Met Gly Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly Ala	
415 420 425	

gct gaa aca ctt aaa ttc aac atg gct cta ata ctt ttc cca gtt tgc Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Phe Pro Val Cys 430 435 440	1346
aga aac acc att act tgg ctt aga tcc aca aga ctc tct tac ttc gtt Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Ser Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Val 445 450 455 460	1394
cct ttt gat gat aat atc aac ttc cac aag aca att gct gga gcc att Pro Phe Asp Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Thr Ile Ala Gly Ala Ile 465 470 475	1442
gta gta gct gtg atc ctt cat att gga gac cat ctt gct tgt gat ttc Val Val Ala Val Ile Leu His Ile Gly Asp His Leu Ala Cys Asp Phe 480 485 490	1490
cct aga att gtt aga gcc acc gaa tac gat tac aat cgg tat ctg ttt Pro Arg Ile Val Arg Ala Thr Glu Tyr Asp Tyr Asn Arg Tyr Leu Phe 495 500 505	1538
cat tac ttt caa aca aaa cag cca aca tac ttc gac ctc gtt aag gga His Tyr Phe Gln Thr Lys Gln Pro Thr Tyr Phe Asp Leu Val Lys Gly 510 515 520	1586
cct gaa gga atc act ggg att tta atg gtc att ttg atg att att tca Pro Glu Gly Ile Thr Gly Ile Leu Met Val Ile Leu Met Ile Ile Ser 525 530 535 540	1634
ttc aca tta gca aca aga tgg ttt agg cgt aac cta gtc aag ctt cct Phe Thr Leu Ala Thr Arg Trp Phe Arg Arg Asn Leu Val Lys Leu Pro 545 550 555	1682
aag cca ttt gat cga cta acc ggt ttt aac gcc ttt tgg tat tcg cat Lys Pro Phe Asp Arg Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His 560 565 570	1730
cat ttg ttc gtc att gtt tat atc ttg ctt att ctt cat ggt atc ttc His Leu Phe Val Ile Val Tyr Ile Leu Leu Ile Leu His Gly Ile Phe 575 580 585	1778
ctc tat ttc gcc aag cct tgg tat gtt cgt acg aca tgg atg tat ctt Leu Tyr Phe Ala Lys Pro Trp Tyr Val Arg Thr Thr Trp Met Tyr Leu 590 595 600	1826
gca gta cca gtt tta ctc tat ggt gga gaa aga aca ctt agg tac ttc Ala Val Pro Val Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Phe 605 610 615 620	1874
cgt tct ggt tct tat tcg gtt cga ctg ctt aag gtt gct ata tat cct Arg Ser Gly Ser Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro 625 630 635	1922
ggt aat gtt cta acg cta caa atg tcg aaa cca act caa ttt cgt tac Gly Asn Val Leu Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro Thr Gln Phe Arg Tyr 640 645 650	1970
aaa agc gga caa tac atg ttt gtc caa tgt cct gcg gtt tcg cca ttc Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe 655 660 665	2018
gag tgg cat cca ttc tca att act tcc gca cct gaa gat gat tat atc Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Glu Asp Asp Tyr Ile 670 675 680	2066
agc att cac att aga caa ctt ggt gat tgg act caa gaa ctc aaa aga Ser Ile His Ile Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg 685 690 695 700	2114

gta ttc tct gaa gtt tgt gag cca ccg gtt ggc ggt aaa agc gga ctt		2162	
Val Phe Ser Glu Val Cys Glu Pro Pro Val Gly Gly Lys Ser Gly Leu			
705	710	715	
ctc aga gcc gac gaa aca aca aag aaa agt ttg cca aag cta ttg ata		2210	
Leu Arg Ala Asp Glu Thr Thr Lys Lys Ser Leu Pro Lys Leu Leu Ile			
720	725	730	
gat gga ccg tac ggt gca cca gca caa gat tat agg aaa tat gat gtt		2258	
Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val			
735	740	745	
ctc tta tta gtt ggt ctt ggc att ggt gca act cca ttt atc agt atc		2306	
Leu Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile			
750	755	760	
ttg aaa gat ttg ctt aac aac att gtt aaa atg gaa gag cat gcg gat		2354	
Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Val Lys Met Glu Glu His Ala Asp			
765	770	775	780
tcg atc tcg gat ttc agt aga tca tca gaa tac agc aca gga agc aac		2402	
Ser Ile Ser Asp Phe Ser Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Asn			
785	790	795	
ggt gac acg cca aga cga aag aga ata cta aaa acc aca aat gct tat		2450	
Gly Asp Thr Pro Arg Arg Lys Arg Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr			
800	805	810	
ttc tac tgg gtc aca aga gaa caa ggc tct ttt gat tgg ttc aaa ggt		2498	
Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly			
815	820	825	
gtc atg aac gaa gtt gca gaa ctt gac caa ccg ggt gtg ata gag atg		2546	
Val Met Asn Glu Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met			
830	835	840	
cat aac tat tta aca agt gtg tat gaa gaa ggt gat gct cgt tct gct		2594	
His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala			
845	850	855	860
ctc att aca atg gttcaa gct ctt aat cat gcc aaa aat ggt gtc gac		2642	
Leu Ile Thr Met Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp			
865	870	875	
att gtc tct ggc act agg gtc aga aca cac ttt gca aga cct aat tgg		2690	
Ile Val Ser Gly Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp			
880	885	890	
aag aag gtt ctc aca aag cta agt tcc aag cat tgc aat gca aga aca		2738	
Lys Lys Val Leu Thr Lys Leu Ser Ser Lys His Cys Asn Ala Arg Thr			
895	900	905	
gga gtg ttt tat tgc gga gta ccg gtt tta ggg aag gag ctt agc aaa		2786	
Gly Val Phe Tyr Cys Gly Val Pro Val Leu Gly Lys Glu Leu Ser Lys			
910	915	920	
cta tgc aac aca ttc aat caa aaa ggt tca acc aag ttt gaa ttt cac		2834	
Leu Cys Asn Thr Phe Asn Gln Lys Gly Ser Thr Lys Phe Glu Phe His			
925	930	935	940
aag gag cat ttc taaaagacaa gaaggaagaa gccaaaagcc ctcttagattc		2886	
Lys Glu His Phe			
ttaatatct caaatatgc cacttatagt ataaaggcaa tctttcact atttaattca		2946	
aagtgattaa acgttaacac actgtcaaaa gtgagtgtgt taacgtttag ctccacacgt		3006	
tcttagttta tatacaccga ggcatacgtg taaatatacg agacagaaga aattcaaggg		3066	

ggttttagatag aagc 3080

<210> 12
<211> 944
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

Met	Lys	Pro	Phe	Ser	Lys	Asn	Asp	Arg	Arg	Arg	Trp	Ser	Phe	Asp	Ser
1				5				10				15			

Val Ser Ala Gly Lys Thr Ala Val Gly Ser Ala Ser Thr Ser Pro Gly

20				25					30						
----	--	--	--	----	--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--

Thr Glu Tyr Ser Ile Asn Gly Asp Gln Glu Phe Val Glu Val Thr Ile

35				40				45							
----	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--

Asp Leu Gln Asp Asp Asp Thr Ile Val Leu Arg Ser Val Glu Pro Ala

50				55				60							
----	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--

Thr Ala Ile Asn Val Ile Gly Asp Ile Ser Asp Asp Asn Thr Gly Ile

65				70				75			80				
----	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	----	--	--	--	--

Met Thr Pro Val Ser Ile Ser Arg Ser Pro Thr Met Lys Arg Thr Ser

85				90				95							
----	--	--	--	----	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--

Ser Asn Arg Phe Arg Gln Phe Ser Gln Glu Leu Lys Ala Glu Ala Val

100				105				110							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Ala Lys Ala Lys Gln Leu Ser Gln Glu Leu Lys Arg Phe Ser Trp Ser

115				120				125							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Arg Ser Phe Ser Gly Asn Leu Thr Thr Ser Thr Ala Ala Asn Gln

130				135				140							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Ser Gly Gly Ala Gly Gly Gly Leu Val Asn Ser Ala Leu Glu Ala Arg

145				150				155			160				
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	-----	--	--	--	--

Ala Leu Arg Lys Gln Arg Ala Gln Leu Asp Arg Thr Arg Ser Ser Ala

165				170				175							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Gln Arg Ala Leu Arg Gly Leu Arg Phe Ile Ser Asn Lys Gln Lys Asn

180				185				190							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Val Asp Gly Trp Asn Asp Val Gln Ser Asn Phe Glu Lys Phe Glu Lys

195				200				205							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Asn Gly Tyr Ile Tyr Arg Ser Asp Phe Ala Gln Cys Ile Gly Met Lys

210				215				220							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Asp Ser Lys Glu Phe Ala Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ser Arg Arg

225				230				235			240				
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	-----	--	--	--	--

Arg Arg Leu Lys Val Glu Lys Ile Asn His Asp Glu Leu Tyr Glu Tyr

245				250				255							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Trp Ser Gln Ile Asn Asp Glu Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Ile Phe

260				265				270							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Phe Asp Ile Val Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Ile Thr Glu Glu Glu

275				280				285							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Val Lys Glu Ile Ile Met Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Arg

290				295				300							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Leu Lys Glu Gln Ala Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu

305				310				315			320				
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	-----	--	--	--	--

Asp Pro Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Glu Leu Trp Gln Leu Glu Thr Leu

325				330				335							
-----	--	--	--	-----	--	--	--	-----	--	--	--	--	--	--	--

Leu Leu Gln Lys Asp Thr Tyr Leu Asn Tyr Ser Gln Ala Leu Ser Tyr
340 345 350

Thr Ser Gln Ala Leu Ser Gln Asn Leu Gln Gly Leu Arg Gly Lys Ser
355 360 365

Arg Ile His Arg Met Ser Ser Asp Phe Val Tyr Ile Met Gln Glu Asn
370 375 380

Trp Lys Arg Ile Trp Val Leu Ser Leu Trp Ile Met Ile Met Ile Gly
385 390 395 400

Leu Phe Leu Trp Lys Phe Phe Gln Tyr Lys Gln Lys Asp Ala Phe His
405 410 415

Val Met Gly Tyr Cys Leu Leu Thr Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu
420 425 430

Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Phe Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile
435 440 445

Thr Trp Leu Arg Ser Thr Arg Leu Ser Tyr Phe Val Pro Phe Asp Asp
450 455 460

Asn Ile Asn Phe His Lys Thr Ile Ala Gly Ala Ile Val Val Ala Val
465 470 475 480

Ile Leu His Ile Gly Asp His Leu Ala Cys Asp Phe Pro Arg Ile Val
485 490 495

Arg Ala Thr Glu Tyr Asp Tyr Asn Arg Tyr Leu Phe His Tyr Phe Gln
500 505 510

Thr Lys Gln Pro Thr Tyr Phe Asp Leu Val Lys Gly Pro Glu Gly Ile
515 520 525

Thr Gly Ile Leu Met Val Ile Leu Met Ile Ile Ser Phe Thr Leu Ala
530 535 540

Thr Arg Trp Phe Arg Arg Asn Leu Val Lys Leu Pro Lys Pro Phe Asp
545 550 555 560

Arg Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe Val
565 570 575

Ile Val Tyr Ile Leu Leu Ile Leu His Gly Ile Phe Leu Tyr Phe Ala
580 585 590

Lys Pro Trp Tyr Val Arg Thr Thr Trp Met Tyr Leu Ala Val Pro Val
595 600 605

Leu Leu Tyr Gly Gly Glu Arg Thr Leu Arg Tyr Phe Arg Ser Gly Ser
610 615 620

Tyr Ser Val Arg Leu Leu Lys Val Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val Leu
625 630 635 640

Thr Leu Gln Met Ser Lys Pro Thr Gln Phe Arg Tyr Lys Ser Gly Gln
645 650 655

Tyr Met Phe Val Gln Cys Pro Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro
660 665 670

Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Glu Asp Asp Tyr Ile Ser Ile His Ile
675 680 685

Arg Gln Leu Gly Asp Trp Thr Gln Glu Leu Lys Arg Val Phe Ser Glu
690 695 700

Val Cys Glu Pro Pro Val Gly Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp
705 710 715 720

Glu Thr Thr Lys Lys Ser Leu Pro Lys Leu Leu Ile Asp Gly Pro Tyr
 725 730 735
 Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Arg Lys Tyr Asp Val Leu Leu Val
 740 745 750
 Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu
 755 760 765
 Leu Asn Asn Ile Val Lys Met Glu Glu His Ala Asp Ser Ile Ser Asp
 770 775 780
 Phe Ser Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Thr Gly Ser Asn Gly Asp Thr Pro
 785 790 795 800
 Arg Arg Lys Arg Ile Leu Lys Thr Thr Asn Ala Tyr Phe Tyr Trp Val
 805 810 815
 Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Glu
 820 825 830
 Val Ala Glu Leu Asp Gln Arg Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Leu
 835 840 845
 Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met
 850 855 860
 Val Gln Ala Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly
 865 870 875 880
 Thr Arg Val Arg Thr His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Lys Lys Val Leu
 885 890 895
 Thr Lys Leu Ser Ser Lys His Cys Asn Ala Arg Thr Gly Val Phe Tyr
 900 905 910
 Cys Gly Val Pro Val Leu Gly Lys Glu Leu Ser Lys Leu Cys Asn Thr
 915 920 925
 Phe Asn Gln Lys Gly Ser Thr Lys Phe Glu Phe His Lys Glu His Phe
 930 935 940

<210> 13
 <211> 3035
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (132)..(2894)
 <223> coding for NADPH-oxidase
 <400> 13
 tcaaaacacct tttgagagcg gttatTTTT ctcttatcaac taatacagta accttacggg 60
 tggTTATTTG tatagatctc tggggTTTC ttggccaact ctgtgagat cttttcgTT 120
 tctcgaattc g atg aaa atg aga cga ggc aat tca agt aac gac cat gaa 170
 Met Lys Met Arg Arg Gly Asn Ser Ser Asn Asp His Glu
 1 5 10
 ctt ggg att cta cga gga gct aac tcg gac acc aac tcg gac acg gag 218
 Leu Gly Ile Leu Arg Gly Ala Asn Ser Asp Thr Asn Ser Asp Thr Glu
 15 20 25
 agc atc gct agc gac cgt ggt gcc ttt agc ggt ccg ctt ggc cg^g cct 266
 Ser Ile Ala Ser Asp Arg Gly Ala Phe Ser Gly Pro Leu Gly Arg Pro
 30 35 40 45

aaa cgt gcg tcc aag aaa aac gca aga ttc gcc gac gat ctt ccc aag		314	
Lys Arg Ala Ser Lys Lys Asn Ala Arg Phe Ala Asp Asp Leu Pro Lys			
50	55	60	
aga agc aat agt gtt gct ggc ggc cgt ggt gat gac gat gag tac gtg		362	
Arg Ser Asn Ser Val Ala Gly Gly Arg Gly Asp Asp Asp Glu Tyr Val			
65	70	75	
gag atc acg cta gac atc agg gac gac tcg gtg gcc gtc cat agt gtc		410	
Glu Ile Thr Leu Asp Ile Arg Asp Asp Ser Val Ala Val His Ser Val			
80	85	90	
caa caa gca gct gga ggt gga ggc cac ctg gag gac ccg gag cta gcc		458	
Gln Gln Ala Ala Gly Gly His Leu Glu Asp Pro Glu Leu Ala			
95	100	105	
ctt ctt acg aag aag act ctc gag agc agc ctc aac aac acc acc tcc		506	
Leu Leu Thr Lys Lys Thr Leu Glu Ser Ser Leu Asn Asn Thr Thr Ser			
110	115	120	125
tta tct ttc ttc cga agc acc tcc tca cgc atc aag aac gcc tcc cgc		554	
Leu Ser Phe Phe Arg Ser Thr Ser Arg Ile Lys Asn Ala Ser Arg			
130	135	140	
gag ctc cgc cgc gtg ttc tct aga cgt ccc tcc ccg gcc gtg cggt cgg		602	
Glu Leu Arg Arg Val Phe Ser Arg Arg Pro Ser Pro Ala Val Arg Arg			
145	150	155	
ttt gac cgc acg agc tcc gcg gcc atc cac gca ctc aaa ggt ctc aag		650	
Phe Asp Arg Thr Ser Ser Ala Ala Ile His Ala Leu Lys Gly Leu Lys			
160	165	170	
tcc att gcc acc aag acg gcc gca tgg ccg gcc gtc gac caa cgt ttc		698	
Phe Ile Ala Thr Lys Thr Ala Ala Trp Pro Ala Val Asp Gln Arg Phe			
175	180	185	
gat aaa ctc tcc gct gat tcc aac ggc ctc tta ctc tct gcc aag ttt		746	
Asp Lys Leu Ser Ala Asp Ser Asn Gly Leu Leu Ser Ala Lys Phe			
190	195	200	205
tgg gaa tgc tta gga atg aat aag gaa tct aaa gac ttc gct gac cag		794	
Trp Glu Cys Leu Gly Met Asn Lys Glu Ser Lys Asp Phe Ala Asp Gln			
210	215	220	
ctc ttt aga gca tta gct cgc cgg aat aac gtc tcc ggc gat gca atc		842	
Leu Phe Arg Ala Leu Ala Arg Arg Asn Asn Val Ser Gly Asp Ala Ile			
225	230	235	
aca aag gaa cag ctt agg ata ttc tgg gaa cag atc tca gac gaa agc		890	
Thr Lys Glu Gln Leu Arg Ile Phe Trp Glu Gln Ile Ser Asp Glu Ser			
240	245	250	
ttt gat gcc aaa ctc caa gtc ttt ttt gac atg gtg gac aaa gat gaa		938	
Phe Asp Ala Lys Leu Gln Val Phe Phe Asp Met Val Asp Lys Asp Glu			
255	260	265	
gat ggg cga gta aca gaa gaa gag gtg gct gag att att agt ctt agt		986	
Asp Gly Arg Val Thr Glu Glu Glu Val Ala Glu Ile Ile Ser Leu Ser			
270	275	280	285
gct tct gca aac aag ctc tca aat att caa aag caa gcc aaa gaa tat		1034	
Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ser Asn Ile Gln Lys Gln Ala Lys Glu Tyr			
290	295	300	
gcg gca ctg ata atg gaa gag ttg gac cca gac aat gct ggg ttt att		1082	
Ala Ala Leu Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Asp Asn Ala Gly Phe Ile			
305	310	315	

atg atc gaa aac ttg gaa atg ttg cta tta caa gca ccg aac cag tcg	320	325	330	1130
Met Ile Glu Asn Leu Glu Met Leu Leu Gln Ala Pro Asn Gln Ser				
gtg cggtatggaa gac agc agg ata ctt agt cag atg tta agt cag aag	335	340	345	1178
Val Arg Met Gly Asp Ser Arg Ile Leu Ser Gln Met Leu Ser Gln Lys				
ctt aga ccg gca aaa gag agc aac cct tta ttg aga tgg tcg gag aaa	350	355	360	1226
Leu Arg Pro Ala Lys Glu Ser Asn Pro Leu Leu Arg Trp Ser Glu Lys				
atc aaa tat ttc ata ctt gat aat tgg cag aga tta tgg atc atg atg	370	375	380	1274
Ile Lys Tyr Phe Ile Leu Asp Asn Trp Gln Arg Leu Trp Ile Met Met				
tta tgg ctt ggc atc tgt ggt ggc ctc ttt act tat aaa ttc att cag	385	390	395	1322
Leu Trp Leu Gly Ile Cys Gly Leu Phe Thr Tyr Lys Phe Ile Gln				
tac aag aac aaa gct gcc tat ggt gtg atg ggt tat tgt gtt tgt gtc	400	405	410	1370
Tyr Lys Asn Lys Ala Ala Tyr Gly Val Met Gly Tyr Cys Val Cys Val				
gcc aaa gga ggc gcc gag act ctc aaa ttc aac atg gct ctc ata ttg	415	420	425	1418
Ala Lys Gly Gly Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu				
ttg cct gtt tgt cga aac acc atc act tgg ctt agg aac aag acc aag	430	435	440	1466
Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Asn Lys Thr Lys				
ctt ggt act gtc gtt cct ttt gat gat agt ctt aac ttc cac aag gtt	450	455	460	1514
Leu Gly Thr Val Val Pro Phe Asp Asp Ser Leu Asn Phe His Lys Val				
att gca agc ggg ata gtc gtc ggt gtt ttg ctc cat gcg ggt gcc cat	465	470	475	1562
Ile Ala Ser Gly Ile Val Val Gly Val Leu Leu His Ala Gly Ala His				
tta acg tgt gat ttt cca cgt tta att gcc gcg gat gag gac acc tat	480	485	490	1610
Leu Thr Cys Asp Phe Pro Arg Leu Ile Ala Ala Asp Glu Asp Thr Tyr				
gag ccg atg gaa aaa tac ttt ggg gat caa ccg act agc tac tgg tgg	495	500	505	1658
Glu Pro Met Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Gln Pro Thr Ser Tyr Trp Trp				
ttt gtg aaa gga gtg gaa gga tgg act ggc att gtg atg gtt gtg cta	510	515	520	1706
Phe Val Lys Gly Val Glu Gly Trp Thr Gly Ile Val Met Val Val Leu				
atg gct ata gcc ttt aca ctc gct acg cct tgg ttc cga cgt aac aag	530	535	540	1754
Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Asn Lys				
ctt aac tta cct aac ttc ctc aag aag ctt acc ggt ttc aac gcc ttt	545	550	555	1802
Leu Asn Leu Pro Asn Phe Leu Lys Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe				
tgg tac acc cac cat ttg ttc atc att gtt tat gct ctt ctc att gtc	560	565	570	1850
Trp Tyr Thr His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ala Leu Leu Ile Val				
cat ggt atc aag ctc tac ctc aca aag att tgg tat cag aag acg aca	575	580	585	1898
His Gly Ile Lys Leu Tyr Leu Thr Lys Ile Trp Tyr Gln Lys Thr Thr				

tgg atg tat ctt gct gta ccc atc ctt cta tat gca tct gag agg ctg Trp Met Tyr Leu Ala Val Pro Ile Leu Leu Tyr Ala Ser Glu Arg Leu 590 595 600 605	1946
ctc cgt gct ttc aga tca agc atc aaa ccg gtt aag atg atc aag gtg Leu Arg Ala Phe Arg Ser Ser Ile Lys Pro Val Lys Met Ile Lys Val 610 615 620	1994
gct gtt tac ccc ggg aac gtg ttg tct cta cac atg acg aag cca caa Ala Val Tyr Pro Gly Asn Val Leu Ser Leu His Met Thr Lys Pro Gln 625 630 635	2042
gga ttc aaa tac aaa agt gga cag ttc atg ttg gtg aac tgc cga gcc Gly Phe Lys Tyr Lys Ser Gly Gln Phe Met Leu Val Asn Cys Arg Ala 640 645 650	2090
gta tct cca ttc gaa tgg cat cct ttc tca atc aca tca gct ccc gga Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly 655 660 665	2138
gac gat tac ctg agc gta cat atc cgc act ctc ggt gac tgg aca cgt Asp Asp Tyr Leu Ser Val His Ile Arg Thr Leu Gly Asp Trp Thr Arg 670 675 680 685	2186
aag ctc agg acc gtt ttc tcc gag gtt tgc aaa cct cct acc gcc ggt Lys Leu Arg Thr Val Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Pro Thr Ala Gly 690 695 700	2234
aaa agc ggt ctt ctc cga gca gac gga gga gat gga aac ctc ccg ttc Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Gly Gly Asp Gly Asn Leu Pro Phe 705 710 715	2282
ccg aag gtc ctt atc gac ggt cca tac ggt gct ccc gca caa gac tac Pro Lys Val Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr 720 725 730	2330
aag aaa tac gac gtg gta ctc ctc gta ggt ctc ggc att gga gcc acg Lys Lys Tyr Asp Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr 735 740 745	2378
cct atg atc agt atc ctt aag gac atc atc aac aac atg aaa ggt cct Pro Met Ile Ser Ile Leu Lys Asp Ile Ile Asn Asn Met Lys Gly Pro 750 755 760 765	2426
gac cgc gac agc gac att gag aac aat aac agt aac aac aat agt aaa Asp Arg Asp Ser Asp Ile Glu Asn Asn Asn Ser Asn Asn Asn Ser Lys 770 775 780	2474
ggg ttt aag aca agg aaa gct tat ttc tac tgg gtg act agg gaa caa Gly Phe Lys Thr Arg Lys Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln 785 790 795	2522
gga tca ttc gag tgg ttc aag gga ata atg gac gag att tcg gag tta Gly Ser Phe Glu Trp Phe Lys Gly Ile Met Asp Glu Ile Ser Glu Leu 800 805 810	2570
gac gag gaa gga atc atc gag ctt cac aat tat tgc acg agt gtg tac Asp Glu Glu Gly Ile Ile Glu Leu His Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr 815 820 825	2618
gag gaa ggt gat gca aga gtg gct ctc att gcc atg ctt cag tcg ttg Glu Glu Gly Asp Ala Arg Val Ala Leu Ile Ala Met Leu Gln Ser Leu 830 835 840 845	2666
caa cac gct aag aac ggt gtg gat gtt gtg tcg ggt aca cgt gtc aag Gln His Ala Lys Asn Gly Val Asp Val Val Ser Gly Thr Arg Val Lys 850 855 860	2714

tcc cac ttc gct aaa cct aac tgg aga caa gtc tac aag aag atc gct 2762
 Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg Gln Val Tyr Lys Ile Ala
 865 870 875

gtt caa cat ccc ggc aaa aga ata gga gtc ttc tac tgt gga atg cca 2810
 Val Gln His Pro Gly Lys Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Met Pro
 880 885 890

gga atg ata aag gaa tta aaa aat cta gct ttg gat ttt tct cga aag 2858
 Gly Met Ile Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ala Leu Asp Phe Ser Arg Lys
 895 900 905

aca act acc aag ttt gac ttc cac aaa gag aac ttc tagattaatt 2904
 Thr Thr Lys Phe Asp Phe His Lys Glu Asn Phe
 910 915 920

atatacgttg tagaaaaata aaacaagaaa caactataca aataaatatt tatTTaaat 2964
 tctttcatt ttatgtaaaa ttatctgagt tatTTTTT tgTTaaaaaa aaaaaaaaaa 3024
 aaaaaaaaaa a 3035

<210> 14
<211> 921
<212> PRT
<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 14

Met Lys Met Arg Arg Gly Asn Ser Ser Asn Asp His Glu Leu Gly Ile
 1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Asn Ser Asp Thr Asn Ser Asp Thr Glu Ser Ile Ala
 20 25 30

Ser Asp Arg Gly Ala Phe Ser Gly Pro Leu Gly Arg Pro Lys Arg Ala
 35 40 45

Ser Lys Lys Asn Ala Arg Phe Ala Asp Asp Leu Pro Lys Arg Ser Asn
 50 55 60

Ser Val Ala Gly Gly Arg Gly Asp Asp Asp Glu Tyr Val Glu Ile Thr
 65 70 75 80

Leu Asp Ile Arg Asp Asp Ser Val Ala Val His Ser Val Gln Gln Ala
 85 90 95

Ala Gly Gly Gly His Leu Glu Asp Pro Glu Leu Ala Leu Leu Thr
 100 105 110

Lys Lys Thr Leu Glu Ser Ser Leu Asn Asn Thr Thr Ser Leu Ser Phe
 115 120 125

Phe Arg Ser Thr Ser Ser Arg Ile Lys Asn Ala Ser Arg Glu Leu Arg
 130 135 140

Arg Val Phe Ser Arg Arg Pro Ser Pro Ala Val Arg Arg Phe Asp Arg
 145 150 155 160

Thr Ser Ser Ala Ala Ile His Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Ala
 165 170 175

Thr Lys Thr Ala Ala Trp Pro Ala Val Asp Gln Arg Phe Asp Lys Leu
 180 185 190

Ser Ala Asp Ser Asn Gly Leu Leu Ser Ala Lys Phe Trp Glu Cys
 195 200 205

Leu Gly Met Asn Lys Glu Ser Lys Asp Phe Ala Asp Gln Leu Phe Arg
 210 215 220

Ala Leu Ala Arg Arg Asn Asn Val Ser Gly Asp Ala Ile Thr Lys Glu
 225 230 235 240
 Gln Leu Arg Ile Phe Trp Glu Gln Ile Ser Asp Glu Ser Phe Asp Ala
 245 250 255
 Lys Leu Gln Val Phe Phe Asp Met Val Asp Lys Asp Glu Asp Gly Arg
 260 265 270
 Val Thr Glu Glu Glu Val Ala Glu Ile Ile Ser Leu Ser Ala Ser Ala
 275 280 285
 Asn Lys Leu Ser Asn Ile Gln Lys Gln Ala Lys Glu Tyr Ala Ala Leu
 290 295 300
 Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Asp Asn Ala Gly Phe Ile Met Ile Glu
 305 310 315 320
 Asn Leu Glu Met Leu Leu Gln Ala Pro Asn Gln Ser Val Arg Met
 325 330 335
 Gly Asp Ser Arg Ile Leu Ser Gln Met Leu Ser Gln Lys Leu Arg Pro
 340 345 350
 Ala Lys Glu Ser Asn Pro Leu Leu Arg Trp Ser Glu Lys Ile Lys Tyr
 355 360 365
 Phe Ile Leu Asp Asn Trp Gln Arg Leu Trp Ile Met Met Leu Trp Leu
 370 375 380
 Gly Ile Cys Gly Gly Leu Phe Thr Tyr Lys Phe Ile Gln Tyr Lys Asn
 385 390 395 400
 Lys Ala Ala Tyr Gly Val Met Gly Tyr Cys Val Cys Val Ala Lys Gly
 405 410 415
 Gly Ala Glu Thr Leu Lys Phe Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val
 420 425 430
 Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Asn Lys Thr Lys Leu Gly Thr
 435 440 445
 Val Val Pro Phe Asp Asp Ser Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala Ser
 450 455 460
 Gly Ile Val Val Gly Val Leu Leu His Ala Gly Ala His Leu Thr Cys
 465 470 475 480
 Asp Phe Pro Arg Leu Ile Ala Ala Asp Glu Asp Thr Tyr Glu Pro Met
 485 490 495
 Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Gln Pro Thr Ser Tyr Trp Trp Phe Val Lys
 500 505 510
 Gly Val Glu Gly Trp Thr Gly Ile Val Met Val Val Leu Met Ala Ile
 515 520 525
 Ala Phe Thr Leu Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Asn Lys Leu Asn Leu
 530 535 540
 Pro Asn Phe Leu Lys Lys Leu Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Thr
 545 550 555 560
 His His Leu Phe Ile Ile Val Tyr Ala Leu Leu Ile Val His Gly Ile
 565 570 575
 Lys Leu Tyr Leu Thr Lys Ile Trp Tyr Gln Lys Thr Thr Trp Met Tyr
 580 585 590
 Leu Ala Val Pro Ile Leu Leu Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Leu Arg Ala
 595 600 605

Phe Arg Ser Ser Ile Lys Pro Val Lys Met Ile Lys Val Ala Val Tyr
 610 615 620

Pro Gly Asn Val Leu Ser Leu His Met Thr Lys Pro Gln Gly Phe Lys
 625 630 635 640

Tyr Lys Ser Gly Gln Phe Met Leu Val Asn Cys Arg Ala Val Ser Pro
 645 650 655

Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr
 660 665 670

Leu Ser Val His Ile Arg Thr Leu Gly Asp Trp Thr Arg Lys Leu Arg
 675 680 685

Thr Val Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Pro Thr Ala Gly Lys Ser Gly
 690 695 700

Leu Leu Arg Ala Asp Gly Gly Asp Gly Asn Leu Pro Phe Pro Lys Val
 705 710 715 720

Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Lys Lys Tyr
 725 730 735

Asp Val Val Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Met Ile
 740 745 750

Ser Ile Leu Lys Asp Ile Ile Asn Asn Met Lys Gly Pro Asp Arg Asp
 755 760 765

Ser Asp Ile Glu Asn Asn Ser Asn Asn Asn Ser Lys Gly Phe Lys
 770 775 780

Thr Arg Lys Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe
 785 790 795 800

Glu Trp Phe Lys Gly Ile Met Asp Glu Ile Ser Glu Leu Asp Glu Glu
 805 810 815

Gly Ile Ile Glu Leu His Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly
 820 825 830

Asp Ala Arg Val Ala Leu Ile Ala Met Leu Gln Ser Leu Gln His Ala
 835 840 845

Lys Asn Gly Val Asp Val Val Ser Gly Thr Arg Val Lys Ser His Phe
 850 855 860

Ala Lys Pro Asn Trp Arg Gln Val Tyr Lys Lys Ile Ala Val Gln His
 865 870 875 880

Pro Gly Lys Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Met Pro Gly Met Ile
 885 890 895

Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ala Leu Asp Phe Ser Arg Lys Thr Thr Thr
 900 905 910

Lys Phe Asp Phe His Lys Glu Asn Phe
 915 920

<210> 15

<211> 3338

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (313)..(3129)

<223> coding for NADPH-oxidase

<400> 15
 ggcacgagaa aatccccaat cttttatgg tttattaaaa tttagtacgcc aagaaaagaaa 60
 gaaagaaaaga cagaaaagact cggtcttcctt tcttctcttg gtctgaaact cccaaataga 120
 ataccaatta ttaatctttt gtcatacttt tccttctcgc gttcatatat actggaatat 180
 acatctttt ttcaacctat cttcttcat tttcaagaat tcgggttcca taaatagtag 240
 gttcactact tttatccaa ctcctttaaa gtttattcat tcataatttt tctcaaagaa 300
 aaaactatag aa atg caa aat tgg gaa aat cat cat ccg cac cac cag cac 351
 Met Gln Asn Ser Glu Asn His His His Pro His His Gln His
 1 5 10
 cac cat tcg gac aca gag ata att gga aat gat aga gcg tcg tac agt 399
 His His Ser Asp Thr Glu Ile Ile Gly Asn Asp Arg Ala Ser Tyr Ser
 15 20 25
 ggt ccg tta agc gga ccg tta aac aaa cga ggc ggc aaa aag agt gcg 447
 Gly Pro Leu Ser Gly Pro Leu Asn Lys Arg Gly Gly Lys Ser Ala
 30 35 40 45
 aga ttt aac att cct gaa tct acc gac atc gga acc agt gtc gga acc 495
 Arg Phe Asn Ile Pro Glu Ser Thr Asp Ile Gly Thr Ser Val Gly Thr
 50 55 60
 ggc ggc aag tcc aat gat gat gcg tac gtt gaa atc act ctc gat gtc 543
 Gly Gly Lys Ser Asn Asp Asp Ala Tyr Val Glu Ile Thr Leu Asp Val
 65 70 75
 cgc gaa gat tcc gtc gct gtc cac agt gtc aaa act gcc ggc ggt gat 591
 Arg Glu Asp Ser Val Ala Val His Ser Val Lys Thr Ala Gly Gly Asp
 80 85 90
 gac gtg gaa gat ccc gag ctg gct tta ttg gct aaa ggc tta gag aag 639
 Asp Val Glu Asp Pro Glu Leu Ala Leu Ala Lys Gly Leu Glu Lys
 95 100 105
 aag tcc act tta gga tct tca ctt gtt cga aat gct tcg tct aga att 687
 Lys Ser Thr Leu Gly Ser Ser Leu Val Arg Asn Ala Ser Ser Arg Ile
 110 115 120 125
 cgg caa gtg tca caa gag ctc agg cgt ttg gct tcc tta aat aaa cgc 735
 Arg Gln Val Ser Gln Glu Leu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Asn Lys Arg
 130 135 140
 cca att cct act gga agg ttc gac agg aat aaa tca gct gct gct cat 783
 Pro Ile Pro Thr Gly Arg Phe Asp Arg Asn Lys Ser Ala Ala Ala His
 145 150 155
 gct ctt aaa ggt ctc aag ttt att agt aag acc gac ggc ggc gct ggt 831
 Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly
 160 165 170
 tgg gcc gcc gtc gag aag cgg ttc gat gag att act gct tct act act 879
 Trp Ala Ala Val Glu Lys Arg Phe Asp Glu Ile Thr Ala Ser Thr Thr
 175 180 185
 ggt ttg ctt cct cgt gcc aaa ttt gga gaa tgt ata ggt atg aat aag 927
 Gly Leu Leu Pro Arg Ala Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Asn Lys
 190 195 200 205
 gag tct aag gaa ttt gct gtt gag cta tat gat gcg cta gct cgg agg 975
 Glu Ser Lys Glu Phe Ala Val Glu Leu Tyr Asp Ala Leu Ala Arg Arg
 210 215 220
 aga aac att aca act gat tcc att aac aaa gca cag ctc aaa gag ttc 1023
 Arg Asn Ile Thr Thr Asp Ser Ile Asn Lys Ala Gln Leu Lys Glu Phe
 225 230 235

tgg gac caa gtg gct gac caa agt ttt gat tct cgc ctt caa aca ttt Trp Asp Gln Val Ala Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Thr Phe 240 245 250	1071
ttt gac atg gtt gat aaa gat gct gat ggt aga att aca gaa gaa gaa Phe Asp Met Val Asp Lys Asp Ala Asp Gly Arg Ile Thr Glu Glu Glu 255 260 265	1119
gtc aga gag att ata ggc ctt agc gcg tcg gcc aac agg ctg tca aca Val Arg Glu Ile Ile Gly Leu Ser Ala Ser Ala Asn Arg Leu Ser Thr 270 275 280 285	1167
atc cag aaa caa gct gat gaa tac gca gca atg atc atg gaa gag ttg Ile Gln Lys Gln Ala Asp Glu Tyr Ala Ala Met Ile Met Glu Glu Leu 290 295 300	1215
gat cct aac aac ctc gga tac att atg att gag aac ttg gaa atg ctt Asp Pro Asn Asn Leu Gly Tyr Ile Met Ile Glu Asn Leu Glu Met Leu 305 310 315	1263
tta ctg caa gca cca aat caa tca gtg caa aga gga ggc gaa agt cgg Leu Leu Gln Ala Pro Asn Gln Ser Val Gln Arg Gly Gly Glu Ser Arg 320 325 330	1311
aac ttg agt caa atg cta agt caa aaa cta aag cat aca caa gag aga Asn Leu Ser Gln Met Leu Ser Gln Lys Leu Lys His Thr Gln Glu Arg 335 340 345	1359
aat cca ata gta aga tgg tac aag agt ttc atg tac ttt ttg ctg gat Asn Pro Ile Val Arg Trp Tyr Lys Ser Phe Met Tyr Phe Leu Leu Asp 350 355 360 365	1407
aat tgg caa aga gtt tgg gta ttg tta ctg tgg att gga att atg gct Asn Trp Gln Arg Val Trp Val Leu Leu Leu Trp Ile Gly Ile Met Ala 370 375 380	1455
ggt cta ttt aca tgg aaa tat ata cag tat aaa gaa aaa gct gca tat Gly Leu Phe Thr Trp Lys Tyr Ile Gln Tyr Lys Glu Lys Ala Ala Tyr 385 390 395	1503
aaa gtc atg ggt ccc tgt gtg tgt ttt gcc aaa ggt gct gct gaa aca Lys Val Met Gly Pro Cys Val Cys Phe Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr 400 405 410	1551
ctc aag ctc aac atg gca att att tta ttt ccg gtt tgc aga aac acg Leu Lys Leu Asn Met Ala Ile Ile Leu Phe Pro Val Cys Arg Asn Thr 415 420 425	1599
atc aca tgg ctt cga aat aag acc aga tta ggt gct gct gtt cct ttt Ile Thr Trp Leu Arg Asn Lys Thr Arg Leu Gly Ala Ala Val Pro Phe 430 435 440 445	1647
gat gat aac ctt aat ttt cac aaa gtg ata gca gtg gca att gct ctt Asp Asp Asn Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala Val Ala Ile Ala Leu 450 455 460	1695
ggg gtt gga ata cac gga cta tct cac ttg aca tgt gat ttt cct cgg Gly Val Gly Ile His Gly Leu Ser His Leu Thr Cys Asp Phe Pro Arg 465 470 475	1743
ctt tta aat gct agt gaa gaa tat gaa cca atg aag tac tat ttt Leu Leu Asn Ala Ser Glu Glu Tyr Glu Pro Met Lys Tyr Tyr Phe 480 485 490	1791
gga gat cag cca gaa agc tat tgg tgg ttt ata aaa gga gta gaa ggg Gly Asp Gln Pro Glu Ser Tyr Trp Trp Phe Ile Lys Gly Val Glu Gly 495 500 505	1839

gta act gga att ata atg gtg gtt tta atg gca ata gca ttt act cta		1887
Val Thr Gly Ile Ile Met Val Val Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu		
510 515 520 525		
gca acc cca tgg ttt aga agg aat aga gtt agt ttg cca aaa cca ttt		1935
Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Asn Arg Val Ser Leu Pro Lys Pro Phe		
530 535 540		
cac aaa ctc act gga tnt aat gcc ttt tgg tac tct cac cat ctc ttt		1983
His Lys Leu Thr Gly Xaa Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe		
545 550 555		
gtt atc gtc tac act ctg ttc att gtg cat ggt gaa aag cta tac att		2031
Val Ile Val Tyr Thr Leu Phe Ile Val His Gly Glu Lys Leu Tyr Ile		
560 565 570		
acc aaa gat tgg tac aag aga acc gac atg gat gta ctt tta act atc		2079
Thr Lys Asp Trp Tyr Lys Arg Thr Asp Met Asp Val Leu Leu Thr Ile		
575 580 585		
cca atc ata ctc tat gct agt gaa agg ttg att agg gca ttc agg tca		2127
Pro Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Ile Arg Ala Phe Arg Ser		
590 595 600 605		
agc att aaa gct gtt aag att ttg aag gtg gca gta tat cca gga aat		2175
Ser Ile Lys Ala Val Lys Ile Leu Lys Val Ala Val Tyr Pro Gly Asn		
610 615 620		
gtg ttg gca ctt cac atg tca aaa cca cag ggc tac aaa tac aaa agt		2223
Val Leu Ala Leu His Met Ser Lys Pro Gln Gly Tyr Lys Tyr Lys Ser		
625 630 635		
ggg caa tac atg ttt gtc aac tgt gct gca gtt tct cca ttt gag tgg		2271
Gly Gln Tyr Met Phe Val Asn Cys Ala Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp		
640 645 650		
cat cca ttt tca att act tcg gcc cca gga gat gac tat ctc agt gtc		2319
His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Val		
655 660 665		
cat att cga act ctt ggt gat tgg acc aggcaa ctt aaa act gtt ttc		2367
His Ile Arg Thr Leu Gly Asp Trp Thr Arg Gln Leu Lys Thr Val Phe		
670 675 680 685		
tcc gag gtt tgc cag cca cca cct aat gga aaa agt gga ctc ctc aga		2415
Ser Glu Val Cys Gln Pro Pro Asn Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg		
690 695 700		
gct gac tac ttg caa gga gag aat aat cct aat ttc cca agg gtg tta		2463
Ala Asp Tyr Leu Gln Gly Glu Asn Asn Pro Asn Phe Pro Arg Val Leu		
705 710 715		
ata gat gga cca tat gga gca cca gca caa gac tac aag aaa tat gag		2511
Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Lys Lys Tyr Glu		
720 725 730		
gtg gtt ttg ttg gta ggt ctt gga att gga gct aca cca atg atc agt		2559
Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Met Ile Ser		
735 740 745		
att gtt aaa gac att gtc aac aac atg aag gca atg gac gaa gaa gaa		2607
Ile Val Lys Asp Ile Val Asn Asn Met Lys Ala Met Asp Glu Glu		
750 755 760 765		
aat tcc ttg gaa gat gga cac aat aat aat atg gca cca aat tct agc		2655
Asn Ser Leu Glu Asp Gly His Asn Asn Asn Met Ala Pro Asn Ser Ser		
770 775 780		

ccc aat att gca aaa aat aag ggt aat aaa tca ggt tca gca agt gga	2703
Pro Asn Ile Ala Lys Asn Lys Gly Asn Lys Ser Gly Ser Ala Ser Gly	
785 790 795	
gga aat aat ttc aat aca agg aga gca tat ttc tat tgg gtt act aga	2751
Gly Asn Asn Phe Asn Thr Arg Arg Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg	
800 805 810	
gaa caa ggt tca ttt gat tgg ttc aaa ggt ata atg aat gaa gct gct	2799
Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ala Ala	
815 820 825	
gaa atg gac cat aag gga gta att gaa atg cat aat tat tgt act agt	2847
Glu Met Asp His Lys Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Cys Thr Ser	
830 835 840 845	
gtt tat gaa gaa ggt gat gct cgt tct gct ctt att act atg ctt cag	2895
Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln	
850 855 860	
tct ctt cac cat gcc aaa aat ggt gtt gac att gtc tct ggc acc aga	2943
Ser Leu His His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr Arg	
865 870 875	
gtt aag tca cat ttt gct aaa cct aat tgg cgt aat gtc tac aaa cgc	2991
Val Lys Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg Asn Val Tyr Lys Arg	
880 885 890	
att gct ctc aac cac cct gag gct aaa gtt ggg gtc ttc tat tgt ggg	3039
Ile Ala Leu Asn His Pro Glu Ala Lys Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly	
895 900 905	
gca cca gca ctg acc aaa gaa cta aga caa cac gcc ttg gat ttt tca	3087
Ala Pro Ala Leu Thr Lys Glu Leu Arg Gln His Ala Leu Asp Phe Ser	
910 915 920 925	
cac aag aca tct acc aag ttt gat ttc cat aaa gaa aat ttt	3129
His Lys Thr Ser Thr Lys Phe Asp Phe His Lys Glu Asn Phe	
930 935	
tgagcaaaga atagaccatt aagcagagca ttaaaaatttc atcaaaaacag ctaaggcacac	3189
agggttgttt atagaagtct accaactctc cctattgtgt acagataatg ttgcacttca	3249
agttgatata tagttgtggt tgtgatgcta gtatattaca aaataataag attattttta	3309
ttttagtagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	3338
<210> 16	
<211> 939	
<212> PRT	
<213> Nicotiana tabacum	
<400> 16	
Met Gln Asn Ser Glu Asn His His Pro His His Gln His His His Ser	
1 5 10 15	
Asp Thr Glu Ile Ile Gly Asn Asp Arg Ala Ser Tyr Ser Gly Pro Leu	
20 25 30	
Ser Gly Pro Leu Asn Lys Arg Gly Gly Lys Ser Ala Arg Phe Asn	
35 40 45	
Ile Pro Glu Ser Thr Asp Ile Gly Thr Ser Val Gly Thr Gly Gly Lys	
50 55 60	
Ser Asn Asp Asp Ala Tyr Val Glu Ile Thr Leu Asp Val Arg Glu Asp	
65 70 75 80	

Ser Val Ala Val His Ser Val Lys Thr Ala Gly Gly Asp Asp Val Glu
 85 90 95
 Asp Pro Glu Leu Ala Leu Leu Ala Lys Gly Leu Glu Lys Lys Ser Thr
 100 105 110
 Leu Gly Ser Ser Leu Val Arg Asn Ala Ser Ser Arg Ile Arg Gln Val
 115 120 125
 Ser Gln Glu Leu Arg Arg Leu Ala Ser Leu Asn Lys Arg Pro Ile Pro
 130 135 140
 Thr Gly Arg Phe Asp Arg Asn Lys Ser Ala Ala Ala His Ala Leu Lys
 145 150 155 160
 Gly Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly Trp Ala Ala
 165 170 175
 Val Glu Lys Arg Phe Asp Glu Ile Thr Ala Ser Thr Thr Gly Leu Leu
 180 185 190
 Pro Arg Ala Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Asn Lys Glu Ser Lys
 195 200 205
 Glu Phe Ala Val Glu Leu Tyr Asp Ala Leu Ala Arg Arg Arg Asn Ile
 210 215 220
 Thr Thr Asp Ser Ile Asn Lys Ala Gln Leu Lys Glu Phe Trp Asp Gln
 225 230 235 240
 Val Ala Asp Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Gln Thr Phe Phe Asp Met
 245 250 255
 Val Asp Lys Asp Ala Asp Gly Arg Ile Thr Glu Glu Glu Val Arg Glu
 260 265 270
 Ile Ile Gly Leu Ser Ala Ser Ala Asn Arg Leu Ser Thr Ile Gln Lys
 275 280 285
 Gln Ala Asp Glu Tyr Ala Ala Met Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Asn
 290 295 300
 Asn Leu Gly Tyr Ile Met Ile Glu Asn Leu Glu Met Leu Leu Leu Gln
 305 310 315 320
 Ala Pro Asn Gln Ser Val Gln Arg Gly Gly Glu Ser Arg Asn Leu Ser
 325 330 335
 Gln Met Leu Ser Gln Lys Leu Lys His Thr Gln Glu Arg Asn Pro Ile
 340 345 350
 Val Arg Trp Tyr Lys Ser Phe Met Tyr Phe Leu Leu Asp Asn Trp Gln
 355 360 365
 Arg Val Trp Val Leu Leu Leu Trp Ile Gly Ile Met Ala Gly Leu Phe
 370 375 380
 Thr Trp Lys Tyr Ile Gln Tyr Lys Glu Lys Ala Ala Tyr Lys Val Met
 385 390 395 400
 Gly Pro Cys Val Cys Phe Ala Lys Gly Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu
 405 410 415
 Asn Met Ala Ile Ile Leu Phe Pro Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp
 420 425 430
 Leu Arg Asn Lys Thr Arg Leu Gly Ala Ala Val Pro Phe Asp Asp Asn
 435 440 445
 Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala Val Ala Ile Ala Leu Gly Val Gly
 450 455 460

Ile His Gly Leu Ser His Leu Thr Cys Asp Phe Pro Arg Leu Leu Asn
 465 470 475 480

Ala Ser Glu Glu Glu Tyr Glu Pro Met Lys Tyr Tyr Phe Gly Asp Gln
 485 490 495

Pro Glu Ser Tyr Trp Trp Phe Ile Lys Gly Val Glu Gly Val Thr Gly
 500 505 510

Ile Ile Met Val Val Leu Met Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Pro
 515 520 525

Trp Phe Arg Arg Asn Arg Val Ser Leu Pro Lys Pro Phe His Lys Leu
 530 535 540

Thr Gly Xaa Asn Ala Phe Trp Tyr Ser His His Leu Phe Val Ile Val
 545 550 555 560

Tyr Thr Leu Phe Ile Val His Gly Glu Lys Leu Tyr Ile Thr Lys Asp
 565 570 575

Trp Tyr Lys Arg Thr Asp Met Asp Val Leu Leu Thr Ile Pro Ile Ile
 580 585 590

Leu Tyr Ala Ser Glu Arg Leu Ile Arg Ala Phe Arg Ser Ser Ile Lys
 595 600 605

Ala Val Lys Ile Leu Lys Val Ala Val Tyr Pro Gly Asn Val Leu Ala
 610 615 620

Leu His Met Ser Lys Pro Gln Gly Tyr Lys Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr
 625 630 635 640

Met Phe Val Asn Cys Ala Ala Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe
 645 650 655

Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Val His Ile Arg
 660 665 670

Thr Leu Gly Asp Trp Thr Arg Gln Leu Lys Thr Val Phe Ser Glu Val
 675 680 685

Cys Gln Pro Pro Pro Asn Gly Lys Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Tyr
 690 695 700

Leu Gln Gly Glu Asn Asn Pro Asn Phe Pro Arg Val Leu Ile Asp Gly
 705 710 715 720

Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr Lys Lys Tyr Glu Val Val Leu
 725 730 735

Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr Pro Met Ile Ser Ile Val Lys
 740 745 750

Asp Ile Val Asn Asn Met Lys Ala Met Asp Glu Glu Asn Ser Leu
 755 760 765

Glu Asp Gly His Asn Asn Asn Met Ala Pro Asn Ser Ser Pro Asn Ile
 770 775 780

Ala Lys Asn Lys Gly Asn Lys Ser Gly Ser Ala Ser Gly Gly Asn Asn
 785 790 795 800

Phe Asn Thr Arg Arg Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly
 805 810 815

Ser Phe Asp Trp Phe Lys Gly Ile Met Asn Glu Ala Ala Glu Met Asp
 820 825 830

His Lys Gly Val Ile Glu Met His Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu
 835 840 845

Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ser Leu His
 850 855 860
 His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Thr Arg Val Lys Ser
 865 870 875 880
 His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg Asn Val Tyr Lys Arg Ile Ala Leu
 885 890 895
 Asn His Pro Glu Ala Lys Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ala
 900 905 910
 Leu Thr Lys Glu Leu Arg Gln His Ala Leu Asp Phe Ser His Lys Thr
 915 920 925
 Ser Thr Lys Phe Asp Phe His Lys Glu Asn Phe
 930 935

<210> 17
<211> 2532
<212> DNA
<213> Oryza sativa
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2529)
<223> coding for NADPH-oxidase
<400> 17
atg gcg tcg ccg tac gac cac cag tcg ccg cat gcg cag cac ccg tcg 48
Met Ala Ser Pro Tyr Asp His Gln Ser Pro His Ala Gln His Pro Ser
 1 5 10 15
ggg ttg ccg agg ccg ccg ggg gcg ggg ggt gct gct gct ggg ggg 96
Gly Leu Pro Arg Pro Pro Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly
 20 25 30
ttc gcg ccg ggg ctg atg aag cag ccg tcg ccg ctg gct tcc ggg gtg 144
Phe Ala Arg Gly Leu Met Lys Gln Pro Ser Arg Leu Ala Ser Gly Val
 35 40 45
agg cag ttc gcg tcg agg gtg tcg atg aag gtg ccg gag ggg gtg ggg 192
Arg Gln Phe Ala Ser Arg Val Ser Met Lys Val Pro Glu Gly Val Gly
 50 55 60
ggg atg cgg ccc ggt ggc ggg agg atg acg ccg atg cag tcc agc gcg 240
Gly Met Arg Pro Gly Gly Arg Met Thr Arg Met Gln Ser Ser Ala
 65 70 75 80
cag gtg ggg ctc ccg ggg ctc ccg ttc ctc gac aag acg tcc ggc ggg 288
Gln Val Gly Leu Arg Gly Leu Arg Phe Leu Asp Lys Thr Ser Gly Gly
 85 90 95
aag gag ggg tgg aag tcc gtc gag cgc cgc ttc gac gag atg aac cgc 336
Lys Glu Gly Trp Lys Ser Val Glu Arg Arg Phe Asp Glu Met Asn Arg
 100 105 110
aac ggc cgc ctc ccc aag gag acg ttc ggc aag tgc atc ggc atg ggg 384
Asn Gly Arg Leu Pro Lys Glu Ser Phe Gly Lys Cys Ile Gly Met Gly
 115 120 125
gac tcc aag gag ttc gcc ggc gag ctg ttc gtg gct ctg gct cgg cgg 432
Asp Ser Lys Glu Phe Ala Gly Glu Leu Phe Val Ala Leu Ala Arg Arg
 130 135 140
agg aac ctg gag ccg gag gac ggc atc acc aag gag cag ctc aag gag 480
Arg Asn Leu Glu Pro Glu Asp Gly Ile Thr Lys Glu Gln Leu Lys Glu
 145 150 155 160

ttc tgg gag gag atg acc gac cag aac ttc gac tcg cg ^g ctt cgc att		528	
Phe Trp Glu Glu Met Thr Asp Gln Asn Phe Asp Ser Arg Leu Arg Ile			
165	170	175	
ttc ttt gac atg tgc gac aag aat ggc gat ggg atg ctc acg gaa gat		576	
Phe Phe Asp Met Cys Asp Lys Asn Gly Asp Gly Met Leu Thr Glu Asp			
180	185	190	
gag gtc aag gag gtt att ata ctg agt gc ^g tcg gc ^g aac aag ctg gc ^g		624	
Glu Val Lys Glu Val Ile Ile Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ala			
195	200	205	
aag ctg aag gga cac gc ^g gc ^g acg tac gc ^g tcg ctg atc atg gag gag		672	
Lys Leu Lys Gly His Ala Ala Thr Tyr Ala Ser Leu Ile Met Glu Glu			
210	215	220	
ctg gac ccg gac gac gc ^g ggg tac atc gag atc tgg cag ctg gag acg		720	
Leu Asp Pro Asp Asp Arg Gly Tyr Ile Glu Ile Trp Gln Leu Glu Thr			
225	230	235	240
ctg ctg cg ^c ggc atg gtg agc gc ^g cag gc ^g gc ^g ccg gag aag atg aag		768	
Leu Leu Arg Gly Met Val Ser Ala Gln Ala Ala Pro Glu Lys Met Lys			
245	250	255	
cg ^g acg acg tcg agc ctc gc ^g agg acg atg atc ccg tcg cg ^g tac ccg		816	
Arg Thr Thr Ser Ser Leu Ala Arg Thr Met Ile Pro Ser Arg Tyr Arg			
260	265	270	
agc ccg ctg aag cg ^g cac gtg tcc agg acg gtg gac ttc gtg cac gag		864	
Ser Pro Leu Lys Arg His Val Ser Arg Thr Val Asp Phe Val His Glu			
275	280	285	
aac tgg aag cg ^g atc tgg ctc gtc gc ^g ctg tgg ctc gcc gtc aac gtc		912	
Asn Trp Lys Arg Ile Trp Leu Val Ala Leu Trp Leu Ala Val Asn Val			
290	295	300	
ggc ctc ttc gcc tac aag ttc gag cag tac gag cg ^g cg ^c gcc gc ^g ttc		960	
Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Tyr Glu Arg Arg Ala Ala Phe			
305	310	315	320
cag gtg atg gg ^c cac tgc gtg tgc gtg gcc aag gg ^c gcc gg ^c gag gtg		1008	
Gln Val Met Gly His Cys Val Cys Val Ala Lys Gly Ala Ala Glu Val			
325	330	335	
ctc aag ctc aac atg gc ^g ctc atc ctc ctc ccc gtg tgc cg ^g aac acg		1056	
Leu Lys Leu Asn Met Ala Leu Ile Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr			
340	345	350	
ctc acc acg ctc agg tcc acg gc ^g ctc agc cac gtc atc ccc ttc gac		1104	
Leu Thr Thr Leu Arg Ser Thr Ala Leu Ser His Val Ile Pro Phe Asp			
355	360	365	
gac aac atc aac ttc cac aag gtg atc gc ^g gc ^g acc atc gcc gc ^g gc ^g		1152	
Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Val Ile Ala Ala Thr Ile Ala Ala Ala			
370	375	380	
acc gcc gtc cac acg ctg gc ^g cac gtc acc tgc gac ttc ccg agg ctg		1200	
Thr Ala Val His Thr Leu Ala His Val Thr Cys Asp Phe Pro Arg Leu			
385	390	395	400
atc aac tgc ccc acg gac aag ttc atg gc ^g acg ctg ggg cc ^g aac ttc		1248	
Ile Asn Cys Pro Ser Asp Lys Phe Met Ala Thr Leu Gly Pro Asn Phe			
405	410	415	
ggg tac agg cag cc ^g acg tac gcc gac ctg ctg gag agc gc ^g cc ^g gg ^c		1296	
Gly Tyr Arg Gln Pro Thr Tyr Ala Asp Leu Leu Glu Ser Ala Pro Gly			
420	425	430	

gtc acc ggc atc ctc atg atc atc atc atg tcc ttc tcc ttc acg ctg		1344
Val Thr Gly Ile Leu Met Ile Ile Ile Met Ser Phe Ser Phe Thr Leu		
435 440 445		
gcc acg cac tcc ttc cgc cg ^g agc gtc gtc aag ctg ccg tcg ccg ctg		1392
Ala Thr His Ser Phe Arg Arg Ser Val Val Lys Leu Pro Ser Pro Leu		
450 455 460		
cac cac ctc gcc ggc ttc aac gcc ttc tgg tac gcg cac cac ctc ctg		1440
His His Leu Ala Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ala His His Leu Leu		
465 470 475 480		
gtg ctc gcc tac gtc ctc gtc gtg cac tcc tac ttc ata ttc ctc		1488
Val Leu Ala Tyr Val Leu Leu Val Val His Ser Tyr Phe Ile Phe Leu		
485 490 495		
acc agg gag tgg tac aag aaa acg aca tgg atg tac ctg ata gtc cca		1536
Thr Arg Glu Trp Tyr Lys Lys Thr Thr Trp Met Tyr Leu Ile Val Pro		
500 505 510		
gtg ctc ttc tat gca tgc gag aga acg atc aga aaa gtt cga gag aac		1584
Val Leu Phe Tyr Ala Cys Glu Arg Thr Ile Arg Lys Val Arg Glu Asn		
515 520 525		
aac tac cgc gtg agc atc gtc aag gca gcg att tac cca gga aat gtg		1632
Asn Tyr Arg Val Ser Ile Val Lys Ala Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val		
530 535 540		
ctc tct ctt cac atg aag aag ccg ccg ggt ttc aag tac aag agc ggg		1680
Leu Ser Leu His Met Lys Lys Pro Pro Gly Phe Lys Tyr Lys Ser Gly		
545 550 555 560		
atg tac ctg ttt gtg aag tgc cct gat gtc tct cct ttc gaa tgg cat		1728
Met Tyr Leu Phe Val Lys Cys Pro Asp Val Ser Pro Phe Glu Trp His		
565 570 575		
ccc ttc tcc atc act tct gca cct gga gat gac tac ctg agt gtg cat		1776
Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Val His		
580 585 590		
atc cgt aca cta ggt gac tgg acg act gaa ctc aga aac ctg tti ggg		1824
Ile Arg Thr Leu Gly Asp Trp Thr Thr Glu Leu Arg Asn Leu Phe Gly		
595 600 605		
aag gct tgc gag gca cag gtt act tct aag aag gct acc ctt tca aga		1872
Lys Ala Cys Glu Ala Gln Val Thr Ser Lys Lys Ala Thr Leu Ser Arg		
610 615 620		
ctt gaa act aca gtt gtg gc ^g gac gct cag aca gag gat act agg ttt		1920
Leu Glu Thr Thr Val Val Ala Asp Ala Gln Thr Glu Asp Thr Arg Phe		
625 630 635 640		
cct aag gtc ctt att gat ggg ccc tat ggt gca ccg gcg caa aac tac		1968
Pro Lys Val Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asn Tyr		
645 650 655		
aag aag tat gac att ctt ttg ctt att ggt ctt gga att ggt gct act		2016
Lys Lys Tyr Asp Ile Leu Leu Ile Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr		
660 665 670		
cct ttc atc agc att ctg aag gat ctg ttg aac aac att aaa tcc aac		2064
Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Lys Ser Asn		
675 680 685		
gaa gag gtg gaa agc ata cat ggt tct gag ata ggc agc ttc aag aac		2112
Glu Glu Val Glu Ser Ile His Gly Ser Glu Ile Gly Ser Phe Lys Asn		
690 695 700		

aat	ggg	cca	gga	aga	gct	tac	ttc	tac	tgg	gtg	acc	aga	gag	caa	ggg	2160
Asn	Gly	Pro	Gly	Arg	Ala	Tyr	Phe	Tyr	Trp	Val	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	
705					710				715						720	
tcc	ttc	gag	tgg	ttt	aaa	gga	gtc	atg	aac	gat	gtc	gct	gaa	agt	gat	2208
Ser	Phe	Glu	Trp	Phe	Lys	Gly	Val	Met	Asn	Asp	Val	Ala	Glu	Ser	Asp	
					725				730						735	
cac	aat	aat	att	ata	gag	atg	cac	aat	tac	ctg	acc	agc	gtg	tat	gaa	2256
His	Asn	Asn	Ile	Ile	Glu	Met	His	Asn	Tyr	Leu	Thr	Ser	Val	Tyr	Glu	
					740				745						750	
gaa	ggc	gac	gca	agg	tca	gct	ttg	att	gcc	atg	gtt	cag	tca	ctt	caa	2304
Glu	Gly	Asp	Ala	Arg	Ser	Ala	Leu	Ile	Ala	Met	Val	Gln	Ser	Leu	Gln	
					755				760						765	
cat	gcc	aaa	aat	ggt	gtg	gat	atc	gtc	tcc	ggc	agc	agg	att	cgc	aca	2352
His	Ala	Lys	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	Ser	Arg	Ile	Arg	Thr	
					770				775						780	
cat	ttt	gcg	agg	cct	aac	tgg	aga	aag	gtg	ttc	tct	gac	ttg	gcg	aat	2400
His	Phe	Ala	Arg	Pro	Asn	Trp	Arg	Lys	Val	Phe	Ser	Asp	Leu	Ala	Asn	
					785				790						800	
gcc	cac	aaa	aac	tca	cgc	ata	ggt	gtt	ttc	tat	tgt	gga	tcc	cct	aca	2448
Ala	His	Lys	Asn	Ser	Arg	Ile	Gly	Val	Phe	Tyr	Cys	Gly	Ser	Pro	Thr	
					805				810						815	
ctc	acg	aaa	caa	ctc	aag	gat	ctt	tca	aaa	gaa	ttc	agc	cag	aca	acc	2496
Leu	Thr	Lys	Gln	Leu	Lys	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu	Phe	Ser	Gln	Thr	Thr	
					820				825						830	
aca	act	aga	ttc	cac	ttc	cac	aag	gaa	aac	ttt	taa					2532
Thr	Thr	Arg	Phe	His	Phe	His	Lys	Glu	Asn	Phe						
					835				840							
<210>	18															
<211>	843															
<212>	PRT															
<213>	Oryza sativa															
<400>	18															
Met	Ala	Ser	Pro	Tyr	Asp	His	Gln	Ser	Pro	His	Ala	Gln	His	Pro	Ser	
1					5				10					15		
Gly	Leu	Pro	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Gly		
					20				25					30		
Phe	Ala	Arg	Gly	Leu	Met	Lys	Gln	Pro	Ser	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	
					35				40					45		
Arg	Gln	Phe	Ala	Ser	Arg	Val	Ser	Met	Lys	Val	Pro	Glu	Gly	Val	Gly	
					50				55					60		
Gly	Met	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Arg	Met	Thr	Arg	Met	Gln	Ser	Ser	Ala	
					65				70					75		80
Gln	Val	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Arg	Phe	Leu	Asp	Lys	Thr	Ser	Gly	Gly	
					85				90					95		
Lys	Glu	Gly	Trp	Lys	Ser	Val	Glu	Arg	Arg	Phe	Asp	Glu	Met	Asn	Arg	
					100				105					110		
Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Phe	Gly	Lys	Cys	Ile	Gly	Met	Gly	
					115				120					125		
Asp	Ser	Lys	Glu	Phe	Ala	Gly	Glu	Leu	Phe	Val	Ala	Leu	Ala	Arg	Arg	
					130				135					140		

Arg Asn Leu Glu Pro Glu Asp Gly Ile Thr Lys Glu Gln Leu Lys Glu
 145 150 155 160
 Phe Trp Glu Glu Met Thr Asp Gln Asn Phe Asp Ser Arg Leu Arg Ile
 165 170 175
 Phe Phe Asp Met Cys Asp Lys Asn Gly Asp Gly Met Leu Thr Glu Asp
 180 185 190
 Glu Val Lys Glu Val Ile Ile Leu Ser Ala Ser Ala Asn Lys Leu Ala
 195 200 205
 Lys Leu Lys Gly His Ala Ala Thr Tyr Ala Ser Leu Ile Met Glu Glu
 210 215 220
 Leu Asp Pro Asp Asp Arg Gly Tyr Ile Glu Ile Trp Gln Leu Glu Thr
 225 230 235 240
 Leu Leu Arg Gly Met Val Ser Ala Gln Ala Ala Pro Glu Lys Met Lys
 245 250 255
 Arg Thr Thr Ser Ser Leu Ala Arg Thr Met Ile Pro Ser Arg Tyr Arg
 260 265 270
 Ser Pro Leu Lys Arg His Val Ser Arg Thr Val Asp Phe Val His Glu
 275 280 285
 Asn Trp Lys Arg Ile Trp Leu Val Ala Leu Trp Leu Ala Val Asn Val
 290 295 300
 Gly Leu Phe Ala Tyr Lys Phe Glu Gln Tyr Glu Arg Arg Ala Ala Phe
 305 310 315 320
 Gln Val Met Gly His Cys Val Cys Val Ala Lys Gly Ala Ala Glu Val
 325 330 335
 Leu Lys Leu Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Thr
 340 345 350
 Leu Thr Thr Leu Arg Ser Thr Ala Leu Ser His Val Ile Pro Phe Asp
 355 360 365
 Asp Asn Ile Asn Phe His Lys Val Ile Ala Ala Thr Ile Ala Ala Ala
 370 375 380
 Thr Ala Val His Thr Leu Ala His Val Thr Cys Asp Phe Pro Arg Leu
 385 390 395 400
 Ile Asn Cys Pro Ser Asp Lys Phe Met Ala Thr Leu Gly Pro Asn Phe
 405 410 415
 Gly Tyr Arg Gln Pro Thr Tyr Ala Asp Leu Leu Glu Ser Ala Pro Gly
 420 425 430
 Val Thr Gly Ile Leu Met Ile Ile Met Ser Phe Ser Phe Thr Leu
 435 440 445
 Ala Thr His Ser Phe Arg Arg Ser Val Val Lys Leu Pro Ser Pro Leu
 450 455 460
 His His Leu Ala Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ala His His Leu Leu
 465 470 475 480
 Val Leu Ala Tyr Val Leu Leu Val Val His Ser Tyr Phe Ile Phe Leu
 485 490 495
 Thr Arg Glu Trp Tyr Lys Lys Thr Thr Trp Met Tyr Leu Ile Val Pro
 500 505 510
 Val Leu Phe Tyr Ala Cys Glu Arg Thr Ile Arg Lys Val Arg Glu Asn
 515 520 525

Asn Tyr Arg Val Ser Ile Val Lys Ala Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Val
 530 535 540
 Leu Ser Leu His Met Lys Lys Pro Pro Gly Phe Lys Tyr Lys Ser Gly
 545 550 555 560
 Met Tyr Leu Phe Val Lys Cys Pro Asp Val Ser Pro Phe Glu Trp His
 565 570 575
 Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Leu Ser Val His
 580 585 590
 Ile Arg Thr Leu Gly Asp Trp Thr Thr Glu Leu Arg Asn Leu Phe Gly
 595 600 605
 Lys Ala Cys Glu Ala Gln Val Thr Ser Lys Lys Ala Thr Leu Ser Arg
 610 615 620
 Leu Glu Thr Thr Val Val Ala Asp Ala Gln Thr Glu Asp Thr Arg Phe
 625 630 635 640
 Pro Lys Val Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asn Tyr
 645 650 655
 Lys Lys Tyr Asp Ile Leu Leu Ile Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
 660 665 670
 Pro Phe Ile Ser Ile Leu Lys Asp Leu Leu Asn Asn Ile Lys Ser Asn
 675 680 685
 Glu Glu Val Glu Ser Ile His Gly Ser Glu Ile Gly Ser Phe Lys Asn
 690 695 700
 Asn Gly Pro Gly Arg Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly
 705 710 715 720
 Ser Phe Glu Trp Phe Lys Gly Val Met Asn Asp Val Ala Glu Ser Asp
 725 730 735
 His Asn Asn Ile Ile Glu Met His Asn Tyr Leu Thr Ser Val Tyr Glu
 740 745 750
 Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu Ile Ala Met Val Gln Ser Leu Gln
 755 760 765
 His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile Val Ser Gly Ser Arg Ile Arg Thr
 770 775 780
 His Phe Ala Arg Pro Asn Trp Arg Lys Val Phe Ser Asp Leu Ala Asn
 785 790 795 800
 Ala His Lys Asn Ser Arg Ile Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ser Pro Thr
 805 810 815
 Leu Thr Lys Gln Leu Lys Asp Leu Ser Lys Glu Phe Ser Gln Thr Thr
 820 825 830
 Thr Thr Arg Phe His Phe His Lys Glu Asn Phe
 835 840

<210> 19
 <211> 2604
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2601)
 <223> coding for NADPH-oxidase

<400> 19

atg tct aga gtg agt ttt gaa gtg tca gga ggc tat cac tct gat gca	48
Met Ser Arg Val Ser Phe Glu Val Ser Gly Gly Tyr His Ser Asp Ala	
1 5 10 15	
gaa gcc gga aac agc gga cca atg agc ggt ggt caa tta cca ccg atc	96
Glu Ala Gly Asn Ser Gly Pro Met Ser Gly Gly Gln Leu Pro Pro Ile	
20 25 30	
tat aaa aaa ccg ggg aac tcc aga ttc act gct gag aac agt cag aga	144
Tyr Lys Lys Pro Gly Asn Ser Arg Phe Thr Ala Glu Asn Ser Gln Arg	
35 40 45	
aca cgt acg gca cca tac gtg gac ctc acg gta gat gta caa gac gat	192
Thr Arg Thr Ala Pro Tyr Val Asp Leu Thr Val Asp Val Gln Asp Asp	
50 55 60	
aca gtc tct gta cat agc ttg aaa atg gaa ggt gga tct agc gtt gaa	240
Thr Val Ser Val His Ser Leu Lys Met Glu Gly Ser Ser Val Glu	
65 70 75 80	
gag agt ccg gag ctt act ttg ctg aaa cga aac cgt ctt gag aag aaa	288
Glu Ser Pro Glu Leu Thr Leu Lys Arg Asn Arg Leu Glu Lys Lys	
85 90 95	
aca acg gtg gtg aaa cgt ttg gcg tct gtt tct cac gag ctt aag cgt	336
Thr Thr Val Val Lys Arg Leu Ala Ser Val Ser His Glu Leu Lys Arg	
100 105 110	
ttg aca tct gtt tct ggt att ggt gga aga aag ccg cct cga ccg	384
Leu Thr Ser Val Ser Gly Gly Ile Gly Arg Lys Pro Pro Arg Pro	
115 120 125	
gct aag tta gac cgg act aaa tcc gcc gcg agt caa gcg ttg aag gga	432
Ala Lys Leu Asp Arg Thr Lys Ser Ala Ala Ser Gln Ala Leu Lys Gly	
130 135 140	
ctt aag ttc att agt aaa acc gac ggt ggc gcc ggt tgg tct gcc gtg	480
Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly Trp Ser Ala Val	
145 150 155 160	
gag aag cgg ttt aat cag att acc gcg act acc ggt gga cta ctt ctt	528
Glu Lys Arg Phe Asn Gln Ile Thr Ala Thr Thr Gly Leu Leu Leu	
165 170 175	
cgg aca aag ttc ggt gaa tgc ata gga atg act tca aag gat ttt gct	576
Arg Thr Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Thr Ser Lys Asp Phe Ala	
180 185 190	
ttg gaa ctg ttt gat gca ttg gct aga aga agg aat ata aca ggg gaa	624
Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ala Arg Arg Asn Ile Thr Gly Glu	
195 200 205	
gtg att gat gga gat caa cta aag gag ttt tgg gaa caa att aat gat	672
Val Ile Asp Gly Asp Gln Leu Lys Glu Phe Trp Glu Gln Ile Asn Asp	
210 215 220	
caa agt ttt gat tct cgg ctt aag aca ttc ttt gac atg gtg gat aaa	720
Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Lys Thr Phe Phe Asp Met Val Asp Lys	
225 230 235 240	
gat gct gat ggt aga ctt aca gaa gac gaa gtt aga gag ttg gag agt	768
Asp Ala Asp Gly Arg Leu Thr Glu Asp Glu Val Arg Glu Leu Glu Ser	
245 250 255	
ctt gag act ctg ctt ttg caa gcg gca aca cag tct gtg ata aca agt	816
Leu Glu Thr Leu Leu Gln Ala Ala Thr Gln Ser Val Ile Thr Ser	
260 265 270	

act ggg gag aga aag aat ctg agt cat atg atg agt cag agg ctt aag		864	
Thr Gly Glu Arg Lys Asn Leu Ser His Met Met Ser Gln Arg Leu Lys			
275	280	285	
cct acg ttt aac cgc aac ccg ttg aag cga tgg tac cgt ggt ctt aga		912	
Pro Thr Phe Asn Arg Asn Pro Leu Lys Arg Trp Tyr Arg Gly Leu Arg			
290	295	300	
ttc ttc ttg tta gac aac tgg caa aga tgt tgg gtt ata gtg cta tgg		960	
Phe Phe Leu Leu Asp Asn Trp Gln Arg Cys Trp Val Ile Val Leu Trp			
305	310	315	320
ttc ata gtt atg gct ata ctc ttc acc tac aaa tat atc caa tac agg		1008	
Phe Ile Val Met Ala Ile Leu Phe Thr Tyr Lys Tyr Ile Gln Tyr Arg			
325	330	335	
cgt agc cct gtg tat cca gtg atg ggt gat tgt gtg tgc atg gct aaa		1056	
Arg Ser Pro Val Tyr Pro Val Met Gly Asp Cys Val Cys Met Ala Lys			
340	345	350	
ggt gct gca gaa aca gtg aag ctg aac atg gct ttg att ctc tta cct		1104	
Gly Ala Ala Glu Thr Val Lys Leu Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro			
355	360	365	
gtt tgt aga aac acc atc aca tgg ctt aga aat aag acc agg ttg ggt		1152	
Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Asn Lys Thr Arg Leu Gly			
370	375	380	
cgt gtt gtc cca ttt gat gac aat ctc aac ttc cac aag gtt ata gcg		1200	
Arg Val Val Pro Phe Asp Asp Asn Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala			
385	390	395	400
gtg ggg att ata gtt gga gta acg atg cac gcc ggg gca cat tta gcg		1248	
Val Gly Ile Ile Val Gly Val Thr Met His Ala Gly Ala His Leu Ala			
405	410	415	
tgt gat ttc ccg cggt tta cta cat gca act cca gag gca tat agg cct		1296	
Cys Asp Phe Pro Arg Leu Leu His Ala Thr Pro Glu Ala Tyr Arg Pro			
420	425	430	
tta aga cag ttt ttt ggg gat gag caa cca aag agc tac tgg cat ttt		1344	
Leu Arg Gln Phe Phe Gly Asp Glu Gln Pro Lys Ser Tyr Trp His Phe			
435	440	445	
gta aac tcg gta gaa ggt ata acc gga ctt gtg atg gtt ttg tta atg		1392	
Val Asn Ser Val Glu Gly Ile Thr Gly Leu Val Met Val Leu Leu Met			
450	455	460	
gcg att gca ttc aca cta gcc acg cct tgg ttc aga aga ggg aag cta		1440	
Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Gly Lys Leu			
465	470	475	480
aac tat ctt cca gga cca tta aag aaa cta gct agc ttc aat gcc ttc		1488	
Asn Tyr Leu Pro Gly Pro Leu Lys Lys Leu Ala Ser Phe Asn Ala Phe			
485	490	495	
tgg tac act cat cat ttg ttt gtc ata gtc tac att ctt ctt gtt gct		1536	
Trp Tyr Thr His His Leu Phe Val Ile Val Tyr Ile Leu Leu Val Ala			
500	505	510	
cat gga tac tac ttg tat ctc acc aga gac tgg cac aat aaa acg act		1584	
His Gly Tyr Tyr Leu Tyr Leu Thr Arg Asp Trp His Asn Lys Thr Thr			
515	520	525	
tgg atg tat ttg gtg gta cca gtg gtt cta tac gcg tgt gaa agg ttg		1632	
Trp Met Tyr Leu Val Val Pro Val Val Leu Tyr Ala Cys Glu Arg Leu			
530	535	540	

ata aga gca ttc agg tcg agc atc aag gcg gtg act att agg aaa gta Ile Arg Ala Phe Arg Ser Ser Ile Lys Ala Val Thr Ile Arg Lys Val 545 550 555 560	1680
gca gtt tat cca gga aac gtg ctg gca att cac ttg tca agg cct caa Ala Val Tyr Pro Gly Asn Val Leu Ala Ile His Leu Ser Arg Pro Gln 565 570 575	1728
aac ttc aaa tac aag agt ggt caa tac atg ttt gtt aac tgt gct gct Asn Phe Lys Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Asn Cys Ala Ala 580 585 590	1776
gtt tct cca ttt gaa tgg cat cca ttt tca atc aca tct gca cca caa Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gln 595 600 605	1824
gat gat tac cta agt gtt cac att aga gtt ctt ggg gat tgg aca cga Asp Asp Tyr Leu Ser Val His Ile Arg Val Leu Gly Asp Trp Thr Arg 610 615 620	1872
gct ctc aaa gga gtc ttc tct gag gtg tgt aag cca cca ccg gca gga Ala Leu Lys Gly Val Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Pro Pro Ala Gly 625 630 635 640	1920
gtt agt ggt ctg ctt aga gcc gac atg ttg cat ggt gca aat aat ccc Val Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Met Leu His Gly Ala Asn Asn Pro 645 650 655	1968
gac ttc ccg aaa gtc ttg att gat ggt cca tat ggt gca cca gca caa Asp Phe Pro Lys Val Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln 660 665 670	2016
gac tac aag aag tac gag gtg gtt cta cta gtt ggt ctc ggg att gga Asp Tyr Lys Tyr Glu Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly 675 680 685	2064
gcc aca cca atg atc agt atc gtc aaa gac att gtt aat aac atc aag Ala Thr Pro Met Ile Ser Ile Val Lys Asp Ile Val Asn Asn Ile Lys 690 695 700	2112
gcc aag gaa caa gcc caa cta aac cga atg gag aat gga aca agc gaa Ala Lys Glu Gln Ala Gln Leu Asn Arg Met Glu Asn Gly Thr Ser Glu 705 710 715 720	2160
cca caa cga agt aag aaa gag agt ttc agg acc cgt aga gct tac ttc Pro Gln Arg Ser Lys Lys Glu Ser Phe Arg Thr Arg Arg Ala Tyr Phe 725 730 735	2208
tat tgg gtt acg cgt gag caa ggc tct ttc gat tgg ttc aag aac ata Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ile 740 745 750	2256
atg aac gaa gtc gcg gaa cga gat gcc aac cgc gtc atc gaa atg cat Met Asn Glu Val Ala Glu Arg Asp Ala Asn Arg Val Ile Glu Met His 755 760 765	2304
aac tat tgt aca agt gtc tat gaa gaa ggt gac gct cgt tcc gca ctt Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu 770 775 780	2352
ata cat atg ctt caa tca cta aac cat gca aag aac ggc gtc gac att Ile His Met Leu Gln Ser Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile 785 790 795 800	2400
gtc tct gga aca aga gtt atg tcc cat ttc gct aaa cct aat tgg aga Val Ser Gly Thr Arg Val Met Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg 805 810 815	2448

aat gtt tac aag cgt ata gct atg gat cat cct aac acc aaa gtt gga	2496
Asn Val Tyr Lys Arg Ile Ala Met Asp His Pro Asn Thr Lys Val Gly	
820 825 830	
gtg ttt tac tgt gga gca cca gca ttg aca aag gag cta agg cat cta	2544
Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ala Leu Thr Lys Glu Leu Arg His Leu	
835 840 845	
gct tta gat ttc acc cac aaa aca agc acc aga ttc tcc ttc cac aaa	2592
Ala Leu Asp Phe Thr His Lys Thr Ser Thr Arg Phe Ser Phe His Lys	
850 855 860	
gag aat ttc taa	2604
Glu Asn Phe	
865	
<210> 20	
<211> 867	
<212> PRT	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 20	
Met Ser Arg Val Ser Phe Glu Val Ser Gly Gly Tyr His Ser Asp Ala	
1 5 10 15	
Glu Ala Gly Asn Ser Gly Pro Met Ser Gly Gly Gln Leu Pro Pro Ile	
20 25 30	
Tyr Lys Lys Pro Gly Asn Ser Arg Phe Thr Ala Glu Asn Ser Gln Arg	
35 40 45	
Thr Arg Thr Ala Pro Tyr Val Asp Leu Thr Val Asp Val Gln Asp Asp	
50 55 60	
Thr Val Ser Val His Ser Leu Lys Met Glu Gly Gly Ser Ser Val Glu	
65 70 75 80	
Glu Ser Pro Glu Leu Thr Leu Leu Lys Arg Asn Arg Leu Glu Lys Lys	
85 90 95	
Thr Thr Val Val Lys Arg Leu Ala Ser Val Ser His Glu Leu Lys Arg	
100 105 110	
Leu Thr Ser Val Ser Gly Gly Ile Gly Gly Arg Lys Pro Pro Arg Pro	
115 120 125	
Ala Lys Leu Asp Arg Thr Lys Ser Ala Ala Ser Gln Ala Leu Lys Gly	
130 135 140	
Leu Lys Phe Ile Ser Lys Thr Asp Gly Gly Ala Gly Trp Ser Ala Val	
145 150 155 160	
Glu Lys Arg Phe Asn Gln Ile Thr Ala Thr Thr Gly Gly Leu Leu Leu	
165 170 175	
Arg Thr Lys Phe Gly Glu Cys Ile Gly Met Thr Ser Lys Asp Phe Ala	
180 185 190	
Leu Glu Leu Phe Asp Ala Leu Ala Arg Arg Asn Ile Thr Gly Glu	
195 200 205	
Val Ile Asp Gly Asp Gln Leu Lys Glu Phe Trp Glu Gln Ile Asn Asp	
210 215 220	
Gln Ser Phe Asp Ser Arg Leu Lys Thr Phe Phe Asp Met Val Asp Lys	
225 230 235 240	
Asp Ala Asp Gly Arg Leu Thr Glu Asp Glu Val Arg Glu Leu Glu Ser	
245 250 255	

Leu Glu Thr Leu Leu Leu Gln Ala Ala Thr Gln Ser Val Ile Thr Ser
 260 265 270
 Thr Gly Glu Arg Lys Asn Leu Ser His Met Met Ser Gln Arg Leu Lys
 275 280 285
 Pro Thr Phe Asn Arg Asn Pro Leu Lys Arg Trp Tyr Arg Gly Leu Arg
 290 295 300
 Phe Phe Leu Leu Asp Asn Trp Gln Arg Cys Trp Val Ile Val Leu Trp
 305 310 315 320
 Phe Ile Val Met Ala Ile Leu Phe Thr Tyr Lys Tyr Ile Gln Tyr Arg
 325 330 335
 Arg Ser Pro Val Tyr Pro Val Met Gly Asp Cys Val Cys Met Ala Lys
 340 345 350
 Gly Ala Ala Glu Thr Val Lys Leu Asn Met Ala Leu Ile Leu Leu Pro
 355 360 365
 Val Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Asn Lys Thr Arg Leu Gly
 370 375 380
 Arg Val Val Pro Phe Asp Asp Asn Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala
 385 390 395 400
 Val Gly Ile Ile Val Gly Val Thr Met His Ala Gly Ala His Leu Ala
 405 410 415
 Cys Asp Phe Pro Arg Leu Leu His Ala Thr Pro Glu Ala Tyr Arg Pro
 420 425 430
 Leu Arg Gln Phe Phe Gly Asp Glu Gln Pro Lys Ser Tyr Trp His Phe
 435 440 445
 Val Asn Ser Val Glu Gly Ile Thr Gly Leu Val Met Val Leu Leu Met
 450 455 460
 Ala Ile Ala Phe Thr Leu Ala Thr Pro Trp Phe Arg Arg Gly Lys Leu
 465 470 475 480
 Asn Tyr Leu Pro Gly Pro Leu Lys Lys Leu Ala Ser Phe Asn Ala Phe
 485 490 495
 Trp Tyr Thr His His Leu Phe Val Ile Val Tyr Ile Leu Leu Val Ala
 500 505 510
 His Gly Tyr Tyr Leu Tyr Leu Thr Arg Asp Trp His Asn Lys Thr Thr
 515 520 525
 Trp Met Tyr Leu Val Val Pro Val Val Leu Tyr Ala Cys Glu Arg Leu
 530 535 540
 Ile Arg Ala Phe Arg Ser Ser Ile Lys Ala Val Thr Ile Arg Lys Val
 545 550 555 560
 Ala Val Tyr Pro Gly Asn Val Leu Ala Ile His Leu Ser Arg Pro Gln
 565 570 575
 Asn Phe Lys Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Phe Val Asn Cys Ala Ala
 580 585 590
 Val Ser Pro Phe Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gln
 595 600 605
 Asp Asp Tyr Leu Ser Val His Ile Arg Val Leu Gly Asp Trp Thr Arg
 610 615 620
 Ala Leu Lys Gly Val Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Pro Pro Ala Gly
 625 630 635 640

Val Ser Gly Leu Leu Arg Ala Asp Met Leu His Gly Ala Asn Asn Pro
 645 650 655
 Asp Phe Pro Lys Val Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln
 660 665 670
 Asp Tyr Lys Lys Tyr Glu Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly
 675 680 685
 Ala Thr Pro Met Ile Ser Ile Val Lys Asp Ile Val Asn Asn Ile Lys
 690 695 700
 Ala Lys Glu Gln Ala Gln Leu Asn Arg Met Glu Asn Gly Thr Ser Glu
 705 710 715 720
 Pro Gln Arg Ser Lys Lys Glu Ser Phe Arg Thr Arg Arg Ala Tyr Phe
 725 730 735
 Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ile
 740 745 750
 Met Asn Glu Val Ala Glu Arg Asp Ala Asn Arg Val Ile Glu Met His
 755 760 765
 Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg Ser Ala Leu
 770 775 780
 Ile His Met Leu Gln Ser Leu Asn His Ala Lys Asn Gly Val Asp Ile
 785 790 795 800
 Val Ser Gly Thr Arg Val Met Ser His Phe Ala Lys Pro Asn Trp Arg
 805 810 815
 Asn Val Tyr Lys Arg Ile Ala Met Asp His Pro Asn Thr Lys Val Gly
 820 825 830
 Val Phe Tyr Cys Gly Ala Pro Ala Leu Thr Lys Glu Leu Arg His Leu
 835 840 845
 Ala Leu Asp Phe Thr His Lys Thr Ser Thr Arg Phe Ser Phe His Lys
 850 855 860
 Glu Asn Phe
 865

<210> 21
<211> 2709
<212> DNA
<213> *Arabidopsis thaliana*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2706)
<223> coding for NADPH-oxidase
<400> 21
atg atg aat cga agt gaa atg caa aag tta ggt ttc gaa cac gtg aga 48
Met Met Asn Arg Ser Glu Met Gln Lys Leu Gly Phe Glu His Val Arg
 1 5 10 15
tac tac aca gag tcg ccg tac aac aga gga gag tcc tcg gcg aac gtg 96
Tyr Tyr Thr Glu Ser Pro Tyr Asn Arg Gly Glu Ser Ser Ala Asn Val
 20 25 30
gcg acg aca agc aac tat tac ggt gaa gat gaa cca tac gtg gag atc 144
Ala Thr Thr Ser Asn Tyr Tyr Gly Glu Asp Glu Pro Tyr Val Glu Ile
 35 40 45

acg cta gat atc cac gac gat tcc gtc tcc gtg tac ggc ttg aag tca		192	
Thr Leu Asp Ile His Asp Asp Ser Val Ser Val Tyr Gly Leu Lys Ser			
50	55	60	
ccg aac cat cga ggg gcc ggg tct aat tat gag gat caa tcg ctt ctc		240	
Pro Asn His Arg Gly Ala Gly Ser Asn Tyr Glu Asp Gln Ser Leu Leu			
65	70	75	80
aga caa ggt cgt tca ggg agg agt aac tcg gta ttg aaa cgc ttg gct		288	
Arg Gln Gly Arg Ser Gly Arg Ser Asn Ser Val Leu Lys Arg Leu Ala			
85	90	95	
tct tct gtt tcc acc gga ata aca cga gtt gct tct tct gtt tct tcg		336	
Ser Ser Val Ser Thr Gly Ile Thr Arg Val Ala Ser Ser Val Ser Ser			
100	105	110	
tct tcc gcg aga aaa cca ccg cgcc cag ctg gct aag ctg cgc cgt		384	
Ser Ser Ala Arg Lys Pro Pro Arg Pro Gln Leu Ala Lys Leu Arg Arg			
115	120	125	
tcg aaa tct aga gca gag cta gct ctc aaa ggt ctt aaa ttc atc acc		432	
Ser Lys Ser Arg Ala Glu Leu Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Thr			
130	135	140	
aag act gat ggt gtc act ggt tgg cct gaa gtt gag aaa cgg ttt tat		480	
Lys Thr Asp Gly Val Thr Gly Trp Pro Glu Val Glu Lys Arg Phe Tyr			
145	150	155	160
gtg atg aca atg act aat aac gga tta tta cac cga tcc aga ttc ggt		528	
Val Met Thr Met Thr Asn Asn Gly Leu Leu His Arg Ser Arg Phe Gly			
165	170	175	
gaa tgt ata ggg atg aaa tcg acg gag ttt gcg ttg gca ttg ttc gat		576	
Glu Cys Ile Gly Met Lys Ser Thr Glu Phe Ala Leu Ala Leu Phe Asp			
180	185	190	
gct tta gcg agg agg gaa aac gta agc gga gat tca ata aac atg aat		624	
Ala Leu Ala Arg Arg Glu Asn Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Met Asn			
195	200	205	
gag ctt aaa gag ttc tgg aag cag atc act gat caa gat ttt gat tca		672	
Glu Leu Lys Glu Phe Trp Lys Gln Ile Thr Asp Gln Asp Phe Asp Ser			
210	215	220	
agg cta cga act ttc ttc gcc atg gtc gat aag gat tcg gat ggg cgg		720	
Arg Leu Arg Thr Phe Ala Met Val Asp Lys Asp Ser Asp Gly Arg			
225	230	235	240
ttg aat gaa gcc gaa gta aga gag att ata act tta agt gct tct gca		768	
Leu Asn Glu Ala Glu Val Arg Glu Ile Ile Thr Leu Ser Ala Ser Ala			
245	250	255	
aac gag ttg gat aac att cgg aga caa gct gat gaa tat gct gct ttg		816	
Asn Glu Leu Asp Asn Ile Arg Arg Gln Ala Asp Glu Tyr Ala Ala Leu			
260	265	270	
att atg gaa gaa ctc gat cct tat cat tat gga tac atc atg ata gag		864	
Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Tyr His Tyr Gly Tyr Ile Met Ile Glu			
275	280	285	
aat ctc gag ata ctt cta ttg caa gcg ccg atg cag gat gtg aga gat		912	
Asn Leu Glu Ile Leu Leu Leu Gln Ala Pro Met Gln Asp Val Arg Asp			
290	295	300	
gga gag agt aag aag cta agc aag atg cta agt cag aat ctc atg gtt		960	
Gly Glu Ser Lys Lys Leu Ser Lys Met Leu Ser Gln Asn Leu Met Val			
305	310	315	320

ccg cag agt agg aat ctc ggg gca cgt ttt tgc aga ggg atg aag tat		1008	
Pro Gln Ser Arg Asn Leu Gly Ala Arg Phe Cys Arg Gly Met Lys Tyr			
325	330	335	
ttt ttg ttt gat aat tgg aag aga gtg tgg gtg atg gct cta tgg ata		1056	
Phe Leu Phe Asp Asn Trp Lys Arg Val Trp Val Met Ala Leu Trp Ile			
340	345	350	
ggt gct atg gcg ggt ttg ttc acg tgg aag ttt atg gag tat cga aaa		1104	
Gly Ala Met Ala Gly Leu Phe Thr Trp Lys Phe Met Glu Tyr Arg Lys			
355	360	365	
aga tcc gct tac gaa gtc atg gga gtt tgt gtt ata gct aaa gga		1152	
Arg Ser Ala Tyr Glu Val Met Gly Val Cys Val Cys Ile Ala Lys Gly			
370	375	380	
gct gca gag acg ctt aaa cta aac atg gct atg att ttg tta cca gtt		1200	
Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu Asn Met Ala Met Ile Leu Leu Pro Val			
385	390	395	400
tgt agg aac acc atc act tgg ctg cgg acc aaa acc aag tta agt gct		1248	
Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Thr Lys Thr Lys Leu Ser Ala			
405	410	415	
att gtt cct ttc gat gac agc ctc aat ttt cac aag gtc ata gct ata		1296	
Ile Val Pro Phe Asp Asp Ser Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala Ile			
420	425	430	
gga att tca gtt gga gtt gga atc cat gct aca tct cac tta gca tgt		1344	
Gly Ile Ser Val Gly Val Gly Ile His Ala Thr Ser His Leu Ala Cys			
435	440	445	
gat ttc ccc cga ctg ata gct gca gac gaa gat cag tat gag cca atg		1392	
Asp Phe Pro Arg Leu Ile Ala Asp Glu Asp Gln Tyr Glu Pro Met			
450	455	460	
gag aag tat ttt ggg cca cag aca aag aga tat ttg gac ttt gtt caa		1440	
Glu Lys Tyr Phe Gly Pro Gln Thr Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Val Gln			
465	470	475	480
tcg gta gaa gga gtt acc ggg att gga atg gtt gta cta atg acc ata		1488	
Ser Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Gly Met Val Val Leu Met Thr Ile			
485	490	495	
gcc ttt aca ttg gct aca aca tgg ttc aga cgt aat aag ctc aac ctt		1536	
Ala Phe Thr Leu Ala Thr Trp Phe Arg Arg Asn Lys Leu Asn Leu			
500	505	510	
cct gga cca ctg aag aaa ata aca ggc ttc aat gcc ttc tgg tac tct		1584	
Pro Gly Pro Leu Lys Lys Ile Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser			
515	520	525	
cac cac tta ttt gtt atc gtc tac tcg ctt gtc gtt cat gga ttc		1632	
His His Leu Phe Val Ile Val Tyr Ser Leu Leu Val Val His Gly Phe			
530	535	540	
tac gta tac ctc atc atc gag cca tgg tac aag aaa acg aca tgg atg		1680	
Tyr Val Tyr Leu Ile Ile Glu Pro Trp Tyr Lys Lys Thr Thr Trp Met			
545	550	555	560
tat ttg atg gta ccg gtg gtt ctt tac ttg tgt gaa agg ctg att cgt		1728	
Tyr Leu Met Val Pro Val Val Leu Tyr Leu Cys Glu Arg Leu Ile Arg			
565	570	575	
gca ttc agg tca agc gtc gag gct gtt tca gtg cta aag gtt gct gtg		1776	
Ala Phe Arg Ser Ser Val Glu Ala Val Ser Val Leu Lys Val Ala Val			
580	585	590	

tta cca ggg aat gtc ttg tcg ctt cac ttg tca aga cca agc aac ttc Leu Pro Gly Asn Val Leu Ser Leu His Leu Ser Arg Pro Ser Asn Phe 595 600 605	1824
aga tac aag agt gga caa tac atg tat ctc aac tgt tct gca gtt tct Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Tyr Leu Asn Cys Ser Ala Val Ser 610 615 620	1872
aca tta gaa tgg cat cca ttc tca att acc tca gct cca gga gat gac Thr Leu Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp 625 630 635 640	1920
tac ctc agt gtc cac atc agg gtt tta gga gac tgg act aag caa tta Tyr Leu Ser Val His Ile Arg Val Leu Gly Asp Trp Thr Lys Gln Leu 645 650 655	1968
aga tca tta ttc tct gag gtg tgc aag cca cgc cct cct gat gaa cac Arg Ser Leu Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Arg Pro Pro Asp Glu His 660 665 670	2016
aga ctg aac aga gcc gac tcg aag cac tgg gat tac atc cct gac ttt Arg Leu Asn Arg Ala Asp Ser Lys His Trp Asp Tyr Ile Pro Asp Phe 675 680 685	2064
cca aga atc cta att gat ggt cca tat gga gca cca gca caa gac tac Pro Arg Ile Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr 690 695 700	2112
aag aag ttt gaa gtt gtt ctg cta gtg ggt cta gga atc ggt gcc act Lys Lys Phe Glu Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr 705 710 715 720	2160
ccg atg atc agc ata gtg agt gac ata atc aat aac ttg aaa ggc gtg Pro Met Ile Ser Ile Val Ser Asp Ile Ile Asn Asn Leu Lys Gly Val 725 730 735	2208
gaa gaa ggc agt aac cga aga cag tca ccg atc cat aat atg gtc aca Glu Glu Gly Ser Asn Arg Arg Gln Ser Pro Ile His Asn Met Val Thr 740 745 750	2256
cct cct gtt tct cca tca aga aaa agt gag acg ttc aga acc aag aga Pro Pro Val Ser Pro Ser Arg Lys Ser Glu Thr Phe Arg Thr Lys Arg 755 760 765	2304
gct tac ttc tac tgg gtc aca aga gag cag ggg tcg ttt gac tgg ttc Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe 770 775 780	2352
aag aac gtg atg gac gaa gtg act gaa aca gac cgc aaa aac gta att Lys Asn Val Met Asp Glu Val Thr Glu Thr Asp Arg Lys Asn Val Ile 785 790 795 800	2400
gag ctg cat aat tac tgc acc agc gtt tac gag gaa ggg gac gcg agg Glu Leu His Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg 805 810 815	2448
tct gca ctt atc acg atg ctc cag tct cta aac cat gct aag cat gga Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ser Leu Asn His Ala Lys His Gly 820 825 830	2496
gtg gac gtt gtg tca gga aca cgt gtc atg tcc cat ttc gct agg cca Val Asp Val Val Ser Gly Thr Arg Val Met Ser His Phe Ala Arg Pro 835 840 845	2544
aac tgg aga agc gtt ttc aaa agg atc gct gtg aat cat cct aag act Asn Trp Arg Ser Val Phe Lys Arg Ile Ala Val Asn His Pro Lys Thr 850 855 860	2592

aga gtc gga gtg ttt tat tgt gga gca gct ggg tta gtg aaa gag tta	2640
Arg Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Lys Glu Leu	
865 870 875 880	
cga cac tta tca ctg gat ttc tct cat aag acc tcc acc aag ttc atc	2688
Arg His Leu Ser Leu Asp Phe Ser His Lys Thr Ser Thr Lys Phe Ile	
885 890 895	
ttc cat aaa gag aat ttc taa	2709
Phe His Lys Glu Asn Phe	
900	
<210> 22	
<211> 902	
<212> PRT	
<213> Arabidopsis thaliana	
<400> 22	
Met Met Asn Arg Ser Glu Met Gln Lys Leu Gly Phe Glu His Val Arg	
1 5 10 15	
Tyr Tyr Thr Glu Ser Pro Tyr Asn Arg Gly Glu Ser Ser Ala Asn Val	
20 25 30	
Ala Thr Thr Ser Asn Tyr Tyr Gly Glu Asp Glu Pro Tyr Val Glu Ile	
35 40 45	
Thr Leu Asp Ile His Asp Asp Ser Val Ser Val Tyr Gly Leu Lys Ser	
50 55 60	
Pro Asn His Arg Gly Ala Gly Ser Asn Tyr Glu Asp Gln Ser Leu Leu	
65 70 75 80	
Arg Gln Gly Arg Ser Gly Arg Ser Asn Ser Val Leu Lys Arg Leu Ala	
85 90 95	
Ser Ser Val Ser Thr Gly Ile Thr Arg Val Ala Ser Ser Val Ser Ser	
100 105 110	
Ser Ser Ala Arg Lys Pro Pro Arg Pro Gln Leu Ala Lys Leu Arg Arg	
115 120 125	
Ser Lys Ser Arg Ala Glu Leu Ala Leu Lys Gly Leu Lys Phe Ile Thr	
130 135 140	
Lys Thr Asp Gly Val Thr Gly Trp Pro Glu Val Glu Lys Arg Phe Tyr	
145 150 155 160	
Val Met Thr Met Thr Asn Asn Gly Leu Leu His Arg Ser Arg Phe Gly	
165 170 175	
Glu Cys Ile Gly Met Lys Ser Thr Glu Phe Ala Leu Ala Leu Phe Asp	
180 185 190	
Ala Leu Ala Arg Arg Glu Asn Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Met Asn	
195 200 205	
Glu Leu Lys Glu Phe Trp Lys Gln Ile Thr Asp Gln Asp Phe Asp Ser	
210 215 220	
Arg Leu Arg Thr Phe Phe Ala Met Val Asp Lys Asp Ser Asp Gly Arg	
225 230 235 240	
Leu Asn Glu Ala Glu Val Arg Glu Ile Ile Thr Leu Ser Ala Ser Ala	
245 250 255	
Asn Glu Leu Asp Asn Ile Arg Arg Gln Ala Asp Glu Tyr Ala Ala Leu	
260 265 270	

Ile Met Glu Glu Leu Asp Pro Tyr His Tyr Gly Tyr Ile Met Ile Glu
 275 280 285
 Asn Leu Glu Ile Leu Leu Gln Ala Pro Met Gln Asp Val Arg Asp
 290 295 300
 Gly Glu Ser Lys Lys Leu Ser Lys Met Leu Ser Gln Asn Leu Met Val
 305 310 315 320
 Pro Gln Ser Arg Asn Leu Gly Ala Arg Phe Cys Arg Gly Met Lys Tyr
 325 330 335
 Phe Leu Phe Asp Asn Trp Lys Arg Val Trp Val Met Ala Leu Trp Ile
 340 345 350
 Gly Ala Met Ala Gly Leu Phe Thr Trp Lys Phe Met Glu Tyr Arg Lys
 355 360 365
 Arg Ser Ala Tyr Glu Val Met Gly Val Cys Val Cys Ile Ala Lys Gly
 370 375 380
 Ala Ala Glu Thr Leu Lys Leu Asn Met Ala Met Ile Leu Leu Pro Val
 385 390 395 400
 Cys Arg Asn Thr Ile Thr Trp Leu Arg Thr Lys Thr Lys Leu Ser Ala
 405 410 415
 Ile Val Pro Phe Asp Asp Ser Leu Asn Phe His Lys Val Ile Ala Ile
 420 425 430
 Gly Ile Ser Val Gly Val Gly Ile His Ala Thr Ser His Leu Ala Cys
 435 440 445
 Asp Phe Pro Arg Leu Ile Ala Ala Asp Glu Asp Gln Tyr Glu Pro Met
 450 455 460
 Glu Lys Tyr Phe Gly Pro Gln Thr Lys Arg Tyr Leu Asp Phe Val Gln
 465 470 475 480
 Ser Val Glu Gly Val Thr Gly Ile Gly Met Val Val Leu Met Thr Ile
 485 490 495
 Ala Phe Thr Leu Ala Thr Thr Trp Phe Arg Arg Asn Lys Leu Asn Leu
 500 505 510
 Pro Gly Pro Leu Lys Lys Ile Thr Gly Phe Asn Ala Phe Trp Tyr Ser
 515 520 525
 His His Leu Phe Val Ile Val Tyr Ser Leu Leu Val Val His Gly Phe
 530 535 540
 Tyr Val Tyr Leu Ile Ile Glu Pro Trp Tyr Lys Lys Thr Thr Trp Met
 545 550 555 560
 Tyr Leu Met Val Pro Val Val Leu Tyr Leu Cys Glu Arg Leu Ile Arg
 565 570 575
 Ala Phe Arg Ser Ser Val Glu Ala Val Ser Val Leu Lys Val Ala Val
 580 585 590
 Leu Pro Gly Asn Val Leu Ser Leu His Leu Ser Arg Pro Ser Asn Phe
 595 600 605
 Arg Tyr Lys Ser Gly Gln Tyr Met Tyr Leu Asn Cys Ser Ala Val Ser
 610 615 620
 Thr Leu Glu Trp His Pro Phe Ser Ile Thr Ser Ala Pro Gly Asp Asp
 625 630 635 640
 Tyr Leu Ser Val His Ile Arg Val Leu Gly Asp Trp Thr Lys Gln Leu
 645 650 655

Arg Ser Leu Phe Ser Glu Val Cys Lys Pro Arg Pro Pro Asp Glu His
 660 665 670
 Arg Leu Asn Arg Ala Asp Ser Lys His Trp Asp Tyr Ile Pro Asp Phe
 675 680 685
 Pro Arg Ile Leu Ile Asp Gly Pro Tyr Gly Ala Pro Ala Gln Asp Tyr
 690 695 700
 Lys Lys Phe Glu Val Val Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Gly Ala Thr
 705 710 715 720
 Pro Met Ile Ser Ile Val Ser Asp Ile Ile Asn Asn Leu Lys Gly Val
 725 730 735
 Glu Glu Gly Ser Asn Arg Arg Gln Ser Pro Ile His Asn Met Val Thr
 740 745 750
 Pro Pro Val Ser Pro Ser Arg Lys Ser Glu Thr Phe Arg Thr Lys Arg
 755 760 765
 Ala Tyr Phe Tyr Trp Val Thr Arg Glu Gln Gly Ser Phe Asp Trp Phe
 770 775 780
 Lys Asn Val Met Asp Glu Val Thr Glu Thr Asp Arg Lys Asn Val Ile
 785 790 795 800
 Glu Leu His Asn Tyr Cys Thr Ser Val Tyr Glu Glu Gly Asp Ala Arg
 805 810 815
 Ser Ala Leu Ile Thr Met Leu Gln Ser Leu Asn His Ala Lys His Gly
 820 825 830
 Val Asp Val Val Ser Gly Thr Arg Val Met Ser His Phe Ala Arg Pro
 835 840 845
 Asn Trp Arg Ser Val Phe Lys Arg Ile Ala Val Asn His Pro Lys Thr
 850 855 860
 Arg Val Gly Val Phe Tyr Cys Gly Ala Ala Gly Leu Val Lys Glu Leu
 865 870 875 880
 Arg His Leu Ser Leu Asp Phe Ser His Lys Thr Ser Thr Lys Phe Ile
 885 890 895
 Phe His Lys Glu Asn Phe
 900

<210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer
 <400> 23
 garcaaggct ctttgattg 20
 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 oligonucleotide primer

<400> 24
gaaaatgctcc ttatggatt c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/07589A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrobohD and AtrobohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 1, 8 January 2002 (2002-01-08), pages 517-522, XP002261415 January 8, 2002 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2003

Date of mailing of the International search report

28/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/07589

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 98/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 11, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 cited in the application the whole document ---	
A	SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 126, no. 3, July 2001 (2001-07), pages 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 the whole document ---	
A	BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 53, no. 372, May 2002 (2002-05), pages 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 the whole document ---	
P,X	HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, vol. 38, no. Special Issue 2, 2002, pages 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 page 459, right-hand column, paragraph 1 ---	1-20
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to <i>Cladosporium fulvum</i>." PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, vol. 61, no. 4, October 2002 (2002-10), pages 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 page 231, left-hand column, paragraph 2 -page 232, left-hand column, paragraph 1; figure 4 page 234, left-hand column, paragraph 3</p> <p>-----</p>	
T	<p>MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, vol. 119, no. 1, September 2003 (2003-09), pages 56-68, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/07589

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHEN UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 1, 8. Januar 2002 (2002-01-08), Seiten 517-522, XP002261415 January 8, 2002 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

13. November 2003

28/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle Internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 98/07589

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, Bd. 11, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	
A	SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 126, Nr. 3, Juli 2001 (2001-07), Seiten 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument ----	
A	BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Bd. 53, Nr. 372, Mai 2002 (2002-05), Seiten 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 das ganze Dokument ----	
P,X	HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, Bd. 38, Nr. Special Issue 2, 2002, Seiten 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 Seite 459, rechte Spalte, Absatz 1 ----	1-20
P,A	BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to <i>Cladosporium fulvum</i> ." PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, Bd. 61, Nr. 4, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 Seite 231, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 232, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 4 Seite 234, linke Spalte, Absatz 3 ----	
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/07589

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENDE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, Bd. 119, Nr. 1, September 2003 (2003-09), Seiten 56-68, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) das ganze Dokument -----	

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

GEÄNDERTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/009820 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
15/24, A01H 5/10

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/007589

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum:
14. Juli 2003 (14.07.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 33 327.0 22. Juli 2002 (22.07.2002) DE

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BASF PLANT SCIENCE GMBH [DE/DE];
c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des geänderten internationalen Recherchenberichts: 11. März 2004

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): KOGEL, Karl-Heinz [DE/DE]; Berggartenstr. 7, 35457 Lollar (DE). HÜCK-ELHOVEN, Ralph [DE/DE]; Glaubrechtstr. 12, 35392 Giessen (DE). TRUJILLO, Marco [DE/DE]; Heegstrauh Weg 10, 35394 Giessen (DE).

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 11/2004 vom 11. März 2004, Section II

(74) Anwalt: PRESSLER, Uwe; .., 67056 Ludwigshafen (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

WO 2004/009820 A1

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING THE PATHOGENIC RESISTANCE IN PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM ERREICHEN EINER PATHOGENRESISTENZ IN PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for obtaining or increasing the pathogenic resistance in plants by reducing the expression, activity or the functioning of a NADPH oxidase.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In international Application No
PCT/EP 03/07589A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 99, no. 1, 8 January 2002 (2002-01-08), pages 517-522, XP002261415</p> <p>January 8, 2002</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>cited in the application the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2003

Date of mailing of the international search report

129.12.03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No.
PCT/EP 03/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (Erysiphe graminis f. sp. hordei)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, vol. 11, no. 4, April 1998 (1998-04), pages 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 cited in the application the whole document ---	
A	SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), vol. 126, no. 3, July 2001 (2001-07), pages 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 the whole document ---	
A	BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 53, no. 372, May 2002 (2002-05), pages 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 the whole document ---	
P,X	HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, vol. 38, no. Special Issue 2, 2002, pages 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 page 459, right-hand column, paragraph 1 --- -/-	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In
PCT/EP 03/07589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to <i>Cladosporium fulvum</i>." <i>PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY</i>, vol. 61, no. 4, October 2002 (2002-10), pages 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 page 231, left-hand column, paragraph 2 -page 232, left-hand column, paragraph 1; figure 4 page 234, left-hand column, paragraph 3</p> <p>-----</p>	
T	<p>MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species." <i>PHYSIOLOGIA PLANTARUM</i>, vol. 119, no. 1, September 2003 (2003-09), pages 56-58, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/07589

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSTANDES
IPK 7 C12N15/82 C12N15/24 A01H5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch-Nr.
A	<p>TORRES MIGUEL ANGEL ET AL: "Arabidopsis gp91phox homologues AttrbohD and AttrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 99, Nr. 1, 8. Januar 2002 (2002-01-08), Seiten 517-522, XP002261415 January 8, 2002 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
18. Dezember 2003	29. 12. 03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/07589

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGENRENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>HUECKELHOVEN RALPH ET AL: "Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (Erysiphe graminis f. sp. hordei)" MOLECULAR PLANT-MICROBE INTERACTIONS, Bd. 11, Nr. 4, April 1998 (1998-04), Seiten 292-300, XP009020951 ISSN: 0894-0282 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>SAGI MOSHE ET AL: "Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection" PLANT PHYSIOLOGY (ROCKVILLE), Bd. 126, Nr. 3, Juli 2001 (2001-07), Seiten 1281-1290, XP002261416 ISSN: 0032-0889 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
A	<p>BOLWELL G PAUL ET AL: "The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system" JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, Bd. 53, Nr. 372, Mai 2002 (2002-05), Seiten 1367-1376, XP002261417 ISSN: 0022-0957 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	
P,X	<p>HUECKELHOVEN R ET AL: "Functional studies on the role of reactive oxygen intermediates in the resistance of barley against powdery mildew." PLANT PROTECTION SCIENCE, Bd. 38, Nr. Special Issue 2, 2002, Seiten 458-460, XP001155865 ISSN: 1212-2580 Seite 459, rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>---</p>	1-20
P,A	<p>BORDEN STEPHANIE ET AL: "Hydrogen peroxide plays a critical role in the defence response of tomato to Cladosporium fulvum." PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR PLANT PATHOLOGY, Bd. 61, Nr. 4, Oktober 2002 (2002-10), Seiten 227-236, XP002261418 ISSN: 0885-5765 Seite 231, linke Spalte, Absatz 2 -Seite 232, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 4 Seite 234, linke Spalte, Absatz 3</p> <p>---</p>	

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Aktenzeichen
PCT/EP 03/07589

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGENENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
T	MAHALINGAM RAMAMURTHY ET AL: "Stress response, cell death and signalling: The many faces of reactive oxygen species." PHYSIOLOGIA PLANTARUM, Bd. 119, Nr. 1, September 2003 (2003-09), Seiten 56-58, XP002261419 ISSN: 0031-9317 (ISSN print) das ganze Dokument -----	

Verfahren zum Erreichen einer Pathogenresistenz in Pflanzen

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung einer Pathogenresistenz in Pflanzen durch Verminderung der Expression, Aktivität oder Funktion einer NADPH Oxidase.

10 Ziel biotechnologischer Arbeiten an Pflanzen ist die Herstellung von Pflanzen mit vorteilhaften, neuen Eigenschaften zum Beispiel zur Steigerung der landwirtschaftlichen Produktivität. Oft sind die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze gegen Pathogene unzureichend. Allein Pilzerkrankungen führen zu Ernteverlusten
15 in der Höhe von vielen Milliarden US-\$ jährlich. Die Einführung fremder Gene aus Pflanzen, Tieren oder mikrobiellen Quellen kann die Abwehr verstärken. Beispiele sind der Schutz gegen Insektenfrass durch Expression von *Bacillus thuringiensis* Endotoxinen (Vaeck et al. (1987) Nature 328:33-37) oder der Schutz gegen
20 Pilzbefall durch Expression einer Chitinase aus Bohne (Broglie et al. (1991) Science 254:1194-1197). Die meisten der beschriebenen Ansätze gewähren jedoch nur eine Resistenz gegen ein einzelnes Pathogen oder gegen ein schmales Spektrum von Pathogenen.
25 Es gibt nur wenige Ansätze, die Pflanzen eine Resistenz gegen ein breiteres Spektrum von Pathogenen verleihen. Die systemische erworbenen Resistenz ("systemic acquired resistance"; SAR) – ein Abwehrmechanismus bei verschiedenen Pflanze/Pathogen-Interaktionen – kann durch Applikation von endogenen Botenstoffen
30 wie Jasmonsäure (JA) oder Salicylsäure (SA) vermittelt werden (Ward et al. (1991) Plant Cell 3:1085-1094; Uknes et al. (1992) Plant Cell 4(6):645-656). Ähnliche Effekte können auch durch synthetische Verbindungen wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-thiocarbonsäure-S-methylester
35 (BTH; Bion®) bewirkt werden (Friedrich et al. (1996) Plant J 10(1):61-70; Lawton et al. (1996) Plant J 10:71-82). Auch die Expression der im Rahmen eines SAR hochregulierten "pathogenesis related" (PR) Proteine vermag zum Teil eine Pathogenresistenz zu bewirken.
40 In Gerste ist der Mlo-Locus als negativer Regulator der Pathogenabwehr beschrieben. Der Verlust des Mlo-Gens bedingt eine erhöhte und rassen-unspezifische Resistenz gegen zahlreiche Arten von Mehltau (Büschgges R et al. (1997) Cell 88:695-705; Jorgensen JH
45 (1977) Euphytica 26:55-62; Lyngkjær MF et al. (1995) Plant Pathol 44:786-790). Durch klassische Züchtung erhaltene Mlo-defiziente Gerstensorten werden bereits in der Landwirtschaft

verwendet. Vermutlich aufgrund der Rezessivität hat sich trotz eines intensiven Anbaus die Resistenz als dauerhaft erwiesen. Mlo-ähnliche Resistenzen in anderen Pflanzen v.a. in Getreidearten sind nicht beschrieben. Das Mlo-Gen und verschiedene Homologe aus anderen Getreidearten wurde identifiziert und kloniert (Büschgges R et al. (1997) Cell 88:695-705; WO 98/04586; Schulze-Lefert P, Vogel J (2000) Trends Plant Sci. 5:343-348). Verschiedene Verfahren unter Verwendung dieser Gene zum Erzielen einer Pathogenresistenz sind beschrieben (WO 98/04586; WO 00/01722; 10 WO 99/47552). Nachteilig ist, dass der Mlo-vermittelte Abwehrmechanismus ein spontanes Absterben von Blattzellen umfasst (Wolter M et al. (1993) Mol Gen Genet 239:122-128). Nachteilig ist ferner, dass die Mlo-defizienten Genotypen eine Hypersuszeptibilität gegen hemibiotrophe Pathogene wie *Magnaporthe grisea* 15 (*M. grisea*) sowie *Cochliobolus sativus* (*Bipolaris sorokiniana*) zeigen (Jarosch B et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:508-514; Kumar J et al. (2001) Phytopathology 91:127-133).

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS; z.B. Superoxid 20 (O_2^-), Hydroxylradikale und H_2O_2) wird eine wichtige protektive Funktion in der Reaktion auf pflanzliche Pathogene zugeordnet (Wojtaszek P (1997) Biochem J 322:681-692). Es sind verschiedene Wege bekannt, wie eine Zelle ROS zu produzieren vermag. In den Makrophagen von Säugetieren ist hier insbesondere die NADPH 25 Oxidase zu nennen, die Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu übertragen vermag. Homologe Enzyme wurden auch in Pflanzen identifiziert (Lamb & Dixon (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:251).

30 Es wurde gezeigt, dass Mutationen in der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase in *Arabidopsis thaliana* eine verminderte Akkumulation reaktiver Sauerstoffintermediate (ROI) zeigen. In Bezug auf die Hypersensitive Reaktion (HR) war das Bild uneinheitlich: Bei einer Doppelmutante wurde bei Infektion mit dem 35 avirulenten *Pseudomonas syringae* Bakterium eine verminderte HR gefunden, während mit dem virulenten Oomyceten *Peronospora parasitica* eine erhöhte HR detektiert wurde. Das Wachstum - sowohl von virulenten als auch von avirulenten *P.syringae* Stämmen - war jedoch - im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen - nicht verändert 40 (Torres MA et al. (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:517-522). Ebenso hatte die Inhibition der NADPH-Oxidase mittels des Inhibitors Diphenyleniodoniumchlorid (DPI) - bei Einsatz physiologisch relevanter Konzentrationen - keinen Effekt auf die Entwicklung pathogener Pilze (Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant 45 Microbe Interact 11:292-300). Ein cDNA Fragment einer Phagozyten NADPH-Oxidase aus Gerste (*pNAox*, Homolog der großen Untereinheit

gp91phox einer Phagozyten NADPHoxidase) ist unter der GenBank Acc.-No.: AJ251717) beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur Pathogenabwehr in Pflanzen bereitzustellen, die eine effiziente Abwehr eines möglichst breiten Spektrum von Pathogenen in möglichst vielen verschiedenen Pflanzenarten, bevorzugt den in der Landwirtschaft verwendeten Kulturpflanzen bewirken. Diese Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren gelöst.

10

Ein erster Gegenstand der Erfindung umfasst ein Verfahren zur Erzeugung oder Erhöhung der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind

15

- a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle derselben und
- 20 b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.

Überraschenderweise zeigt die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase aus Gerste (pNAox) in der epidermalen Zelle durch einen sequenzspezifischen RNA-Interferenz Ansatz unter Verwendung doppelsträngiger pNAox-dsRNA ("Gene-Silencing") einen signifikant reduzierten Befall infolge einer Bgh-Infektion (gemessen anhand der Haustorium-Ausbildung). Dieser Befund ist insbesondere deshalb überraschend, da der mit der NADPH-Oxidase in Verbindung gebrachten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ("oxidative burst") im allgemeinen eine protektive Funktion zugemessen wird.

Ähnlich wie Mlo vermittelt die Verminderung der NADPH-Oxidase Expression eine breite Resistenz gegen verschiedene Isolate von Blumeria graminis f.sp. hordei. In transienten "Gene-Silencing"-Experimenten wird dabei die Penetrationseffizienz (Haustorien-Bildung) von Bgh signifikant um mehr als 35 % reduziert - ein Effekt, der in seiner Stärke dem mittels Mlo-dsRNA erreichten entspricht (Schweizer P et al. (2000) Plant J 24:895-903). In der Wildtyp Gerstensorte Pallas führen ca. 40 % der Pilzpenetrations zu einer Haustorien-Bildung, wohingegen die Penetrationsrate bei einer Verminderung der NADPH-Oxidase Expression mittels Einbringen einer doppelsträngigen RNA der NADPH-Oxidase (pNAox-dsRNA) nur ca. 25 % beträgt. Die Tatsache, dass auch in pathogenempfindlichen Wildtyp-Sorten wie Pallas nur eine Penetration von ca. 40 bis 50 % beobachtet werden kann, ist auf die stets

vorhandene Basalresistenz zurückzuführen. Die NADPH-Oxidase ist aufgrund der dieser Befunde als Schlüsselement für das erfolgreiche Eindringen eines Pathogens wie Bgh in die pflanzliche Zelle zu verstehen. Darüberhinaus ist das Verfahren allen 5 Verfahren überlegen, bei denen ein pathogen-resistenter Phänotyp durch Überexpression eines resistenzvermittelnden Proteins realisiert wird. Das Ausschalten eines Gens, lässt sich ohne Expression eines (Fremd)-Proteins realisieren. Im Idealfall wird lediglich das endogene Gen deaktiviert. Dies hat nicht zu ver- 10 nachlässige Vorteile bei der Zulassung und der Akzeptanz durch den Verbraucher, der Pflanzen mit Fremdproteinen oft mit Vorbehalt begegnet. Ganz besonders vorteilhaft ist in diesem Zusammenhang die Verwendung von induzierbaren Promotoren zur Verminderung der NADPH-Oxidasemenge, Aktivität oder Funktion, was beispiele- 15 weise bei Verwendung von pathogeninduzierbaren Promotoren eine Expression nur im Bedarfsfall (d.h. Pathogenbefall) ermöglicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf alle Pflanzenarten angewendet werden. Bevorzugt auf solche, in denen natür- 20 licherweise eine NADPH-Oxidase oder ein funktionelles Äquivalent derselben exprimiert wird.

"Pflanze" im Rahmen der Erfindung meint alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des Pflanzenreiches. 25 Eingeschlossen unter dem Begriff sind die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut, Pflanzenorgane, Gewebe, Protoplasten, Kallus und andere Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen, sowie alle anderen Arten von Gruppierungen von Pflanzenzellen zu funktionellen oder 30 strukturellen Einheiten. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. "Pflanze" umfasst alle einjährige und mehrjährige, monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen und schließt beispiel- 35 haft jedoch nicht einschränkend solche der Gattungen Cucurbita, Rosa, Vitis, Juglans, Fragaria, Lotus, Medicago, Onobrychis, Trifolium, Trigonella, Vigna, Citrus, Linum, Geranium, Manihot, Daucus, Arabidopsis, Brassica, Raphanus, Sinapis, Atropa, Capsicum, Datura, Hyoscyamus, Lycopersicon, Nicotiana, Solarium, 40 Petunia, Digitalis, Majorana, Cichorium, Helianthus, Lactuca, Bromus, Asparagus, Antirrhinum, Heterocallis, Nemesis, Pelargonium, Panicum, Pennisetum, Ranunculus, Senecio, Salpiglossis, Cucumis, Browalia, Glycine, Pisum, Phaseolus, Lolium, Oryza, Zea, Avena, Hordeum, Secale, Triticum, Sorghum, Picea und Populus 45 ein.

Der Begriff "Pflanze" umfasst bevorzugt monokotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel Getreidearten wie Weizen, Gerste, Hirse, Roggen, Triticale, Mais, Reis, Sorghum oder Hafer sowie Zuckerrohr.

5

Ferner umfasst der Begriff dikotyle Kulturpflanzen, wie zum Beispiel

- Brassicaceae wie Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten oder Canola, Leguminosae wie Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen oder Erdnuss
- Solanaceae wie Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine oder Paprika, Asteraceae wie Sonnenblume, Tagetes, Salat oder Calendula,
- Cucurbitaceae wie Melone, Kürbis oder Zucchini, sowie Lein, Baumwolle, Hanf, Klee, Spinat, Flachs, Roter Pfeffer, Möhre, Karotte, Rübe, Rettich, Zuckerrübe, Süßkartoffel, Gurke, Chicorée, Blumenkohl, Brokkoli, Spargel, Zwiebel, Knoblauch, Sellerie, Erdbeere, Himbeere, Brombeere, Ananas, Avocado, und den verschiedenen Baum-, Strauch-, Nuss- und Weinarten. Baumarten umfasst bevorzugt Pflaume, Kirsche, Pfirsich, Nektarine, Aprikose, Banane, Papaya, Mango, Apfel, Birne, Quitte.

Ferner umfasst sind Schmuckpflanzen, Nutz- oder Zierbäume, Blumen, Schnittblumen, Sträuchern oder Rasen wie beispielhaft aber nicht einschränkend die Familien der Rosaceae wie Rose, Ericaceae wie Rhododendrons und Azaleen, Euphorbiaceae wie Weihnachtssterne und Kroton, Caryophyllaceae wie Nelken, Solanaceae wie Petunien, Gesneriaceae wie das Usambaraveilchen, Balsaminaceae wie das Springkraut, Orchidaceae wie Orchideen, Iridaceae wie Gladiolen, Iris, Freesie und Krokus, Compositae wie Ringelblume, Geraniaceae wie Geranien, Liliaceae wie der Drachenbaum, Moraceae wie Ficus, Araceae wie Philodendron und andere mehr.

Im Rahmen der Erfindung sind solche Pflanzen bevorzugt, die als Nahrungs- oder Futtermittel zum Einsatz kommen, ganz besonders bevorzugt monokotyle Gattungen und Arten, wie die beschriebenen Getreidearten.

Ganz besonders bevorzugt wird das Verfahren auf monokotyle Pflanzen, am meisten bevorzugt auf Pflanzen mit landwirtschaftlicher Bedeutung wie Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais,

Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr angewendet.

"Pathogenresistenz" meint das Vermindern oder Abschwächen von 5 Krankheitssymptomen einer Pflanze infolge eines Befalls durch ein Pathogen. Die Symptome können vielfältiger Art sein, umfassen aber bevorzugt solche die direkt oder indirekt zu einer Beeinträchtigung Qualität der Pflanze, der Quantität des Ertrages, der Eignung zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel 10 führen oder aber auch Aussaat, Anbau, Ernte oder Prozessierung des Erntegutes erschweren.

"Verleihen", "bestehen", "erzeugen" oder "erhöhen" einer Pathogenresistenz meint, dass die Abwehrmechanismen einer bestimmten 15 Pflanzenart oder -sorte durch Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens im Vergleich zu dem Wildtyp der Pflanze ("Ausgangspflanze"), auf den das erfindungsgemäße Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonsten gleichen Bedingungen (wie beispielsweise Klima- oder Anbaubedingungen, Pathogenart etc.) eine 20 erhöhte Resistenz gegen ein und mehr Pathogene aufweist. Dabei äußert sich die erhöhte Resistenz bevorzugt in einer verminderten Ausprägung der Krankheitssymptome, wobei Krankheitssymptome – neben den oben erwähnten Beeinträchtigungen – auch beispielsweise die Penetrationseffizienz eines Pathogens in die Pflanze oder 25 pflanzliche Zellen oder die Proliferationseffizienz in oder auf denselben umfasst. Dabei sind die Krankheitssymptome bevorzugt um mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 % 30 vermindert.

"Auswahl" meint in Bezug auf Pflanzen, bei denen – im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze – die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist, all die Verfahren, 35 die eine zur Erkennung einer vorliegenden oder erhöhten Pathogenresistenz geeignet sind. Dies können Symptome der Pathogeninfektion sein (z.B. Haustorium-Ausbildung bei Pilzinfektion) aber auch die oben beschriebenen Symptome umfassen, die die Qualität der Pflanze, die Quantität des Ertrages, die Eignung 40 zur Verwendung als Futter- oder Nahrungsmittel usw. betreffen.

"Pathogen" meint im Rahmen der Erfindung beispielsweise jedoch nicht einschränkend Viren oder Viroide, Bakterien, Pilze, tierische Schädlinge, wie beispielsweise Insekten oder Nematoden. 45 Besonders bevorzugt sind Pilze wie beispielsweise der Mehltau. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase, ihrer Aktivität oder Funktion auch eine Resistenz

gegen weitere Pathogene bewirkt. Beispielsweise jedoch nicht einschränkend seien nachfolgende Pathogene zu nennen:

1. Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene:

5 Pilzpathogene oder pilzähnliche Pathogene (wie z.B. Chromista) stammen vorzugsweise aus der Gruppe umfassend Plasmodiophoramycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten (Fungi imperfecti).

10 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 1 und 2 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 1: Pflanzliche Pilzerkrankungen

15

	Erkrankung	Pathogen
	Braunrost	<i>Puccinia recondita</i>
	Gelbrost	<i>P. striiformis</i>
20	Echter Mehltau	<i>Erysiphe graminis / Blumeria graminis</i>
	Spelzenbräune	<i>Septoria nodorum</i>
	Blattdürre	<i>Septoria tritici</i>
	Ährenfusariosen	<i>Fusarium spp.</i>
25	Halmbruchkrankheit	<i>Pseudocercospora herpotrichoides</i>
	Flugbrand	<i>Ustilago spp.</i>
	Weizensteinbrand	<i>Tilletia caries</i>
	Schwarzbeinigkeit	<i>Gaeumannomyces graminis</i>
30	Anthrocnoise leaf blight	<i>Colletotrichum graminicola</i> (teleomorph: <i>Glomerella graminicola</i> Politis); <i>Glomerella tucumanensis</i> (anamorph: <i>Glomerella falcatum</i> Went)
	Anthracnose stalk rot	
	Aspergillus ear and kernel rot	<i>Aspergillus flavus</i>
35	Banded leaf and sheath spot ("Wurzeltöter")	<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn = <i>Rhizoctonia microsclerotia</i> J. Matz (telomorph: <i>Thanatephorus cucumeris</i>)
	Black bundle disease	<i>Acremonium strictum</i> W. Gams = <i>Cephalosporium acremonium</i> Auct. non Corda
40	Black kernel rot	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> = <i>Botryodiplodia theobromae</i>
	Borde blanco	<i>Marasmiellus</i> sp.
	Brown spot (black spot, stalk rot)	<i>Physoderma maydis</i>
45	Cephalosporium kernel rot	<i>Acremonium strictum</i> = <i>Cephalosporium acremonium</i>
	Charcoal rot	<i>Macrophomina phaseolina</i>

	Erkrankung	Pathogen
	Corticium ear rot	<i>Thanatephorus cucumeris</i> = <i>Corticium sasakii</i>
5	Curvularia leaf spot	<i>Curvularia clavata</i> , <i>C. eragrostidis</i> = <i>C. maculans</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus eragrostidis</i>), <i>Curvularia inaequalis</i> , <i>C. intermedia</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus intermedius</i>), <i>Curvularia lunata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus lunatus</i>), <i>Curvularia pallens</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus pallens</i>), <i>Curvularia senegalensis</i> , <i>C. tuberculata</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus tuberculatus</i>)
10	Didymella leaf spot	<i>Didymella exitalis</i>
15	Diplodia ear rot and stalk rot	<i>Diplodia frumenti</i> (teleomorph: <i>Botryosphaeria festucae</i>)
	Diplodia ear rot, stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Diplodia maydis</i> = <i>Stenocarpella maydis</i>
20	Diplodia leaf spot or streak	<i>Stenocarpella macrospora</i> = <i>Diplodialeaf macrospora</i>

Tabelle 2: Falscher Mehltau

	Erkrankung	Pathogen
25	Brown stripe downy mildew	<i>Sclerotinia rayssiae</i> var. <i>zeae</i>
	Crazy top downy mildew	<i>Sclerotinia macrospora</i> = <i>Sclerospora macrospora</i>
30	Green ear downy mildew (graminicola downy mildew)	<i>Sclerospora graminicola</i>
	Java downy mildew	<i>Peronosclerospora maydis</i> = <i>Sclerospora maydis</i>
35	Philippine downy mildew	<i>Peronosclerospora philippinensis</i> = <i>Sclerospora philippinensis</i>
	Sorghum downy mildew	<i>Peronosclerospora sorghi</i> = <i>Sclerospora sorghi</i>
40	Spontaneum downy mildew	<i>Peronosclerospora spontanea</i> = <i>Sclerospora spontanea</i>
	Sugarcane downy mildew	<i>Peronosclerospora sacchari</i> = <i>Sclerospora sacchari</i>
	Dry ear rot (cob, kernel and stalk rot)	<i>Nigrospora oryzae</i> (teleomorph: <i>Khuskia oryzae</i>)

	Erkrankung	Pathogen
5	Ear rots, minor	<i>Alternaria alternata</i> = <i>A. tenuis</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i> (teleomorph: <i>Botryotinia fuckeliana</i>), <i>Cunninghamella</i> sp., <i>Curvularia pallescens</i> , <i>Doratomyces stemonitis</i> = <i>Cephalotrichum stemonitis</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Gonatobotrys simplex</i> , <i>Pithomyces maydicus</i> , <i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh., <i>R. stolonifer</i> = <i>R. nigricans</i> , <i>Scopulariopsis brumptii</i>
10		
15	Ergot (horse's tooth)	<i>Claviceps gigantea</i> (anamorph: <i>Sphacelia</i> sp.)
	Eyespot	<i>Aureobasidium zeae</i> = <i>Kabatiella zeae</i>
	Fusarium ear and stalk rot	<i>Fusarium subglutinans</i> = <i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>
20	Fusarium kernel, root and stalk rot, seed rot and seedling blight	<i>Fusarium moniliforme</i> (teleomorph: <i>Gibberella fujikuroi</i>)
	Fusarium stalk rot, seedling root rot	<i>Fusarium avenaceum</i> (teleomorph: <i>Gibberella avenacea</i>)
25	Gibberella ear and stalk rot (Ähren- u. Stengelfäule)	<i>Gibberella zeae</i> (anamorph: <i>Fusarium graminearum</i>)
	Gray ear rot	<i>Botryosphaeria zeae</i> = <i>Physalospora zeae</i> (anamorph: <i>Macrophoma zeae</i>)
30	Gray leaf spot (Cercospora leaf spot)	<i>Cercospora sorghi</i> = <i>C. sorghi</i> var. <i>maydis</i> , <i>C. zeae-maydis</i>
	Helminthosporium root rot	<i>Exserohilum pedicellatum</i> = <i>Helminthosporium pedicellatum</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria pedicellata</i>)
35	Hormodendrum ear rot (Cladosporium rot)	<i>Cladosporium cladosporioides</i> = <i>Hormodendrum cladosporioides</i> , <i>C. herbarum</i> (teleomorph: <i>Mycosphaerella tassiana</i>)
	Hyalothyridium leaf spot	<i>Hyalothyridium maydis</i>
	Late wilt	<i>Cephalosporium maydis</i>

	Erkrankung	Pathogen
5	Leaf spots, minor	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta maydis</i> , <i>A. tritici</i> , <i>A. zeicola</i> , <i>Bipolaris victoriae</i> = <i>Helminthosporium victoriae</i> (teleomorph: <i>Cochliobolus victoriae</i>), <i>C. sativus</i> (anamorph: <i>Bipolaris sorokiniana</i> = <i>H. sorokinianum</i> = <i>H. sativum</i>), <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Exserohilum prolatum</i> = <i>Drechslera prolata</i> (teleomorph: <i>Setosphaeria prolata</i>) <i>Graphium penicilliodes</i> , <i>Leptosphaeria maydis</i> , <i>Leptothyrium zae</i> , <i>Ophiophaerella herpotricha</i> , (anamorph: <i>Scolecosporiella sp.</i>), <i>Paraphaeosphaeria michotii</i> , <i>Phoma sp.</i> , <i>Septoria zae</i> , <i>S. zeicola</i> , <i>S. zeina</i>
10		
15		
20	Northern corn leaf blight (white blast, crown stalk rot, stripe)	<i>Setosphaeria turcica</i> (anamorph: <i>Exserohilum turcicum</i> = <i>Helminthosporium turcicum</i>)
25	Northern corn leaf spot Helminthosporium ear rot (race 1)	<i>Cochliobolus carbonum</i> (anamorph: <i>Bipolaris zeicola</i> = <i>Helminthosporium carbonum</i>)
30	Penicillium ear rot (blue eye, blue mold)	<i>Penicillium spp.</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. oxalicum</i>
35	Phaeocystostroma stalk rot and root rot	<i>Phaeocystostroma ambiguum</i> , = <i>Phaeocystosporella zae</i>
40	Phaeosphaeria leaf spot	<i>Phaeosphaeria maydis</i> = <i>Sphaerulina maydis</i>
	Physalospora ear rot (Botryosphaeria ear rot)	<i>Botryosphaeria festucae</i> = <i>Physalospora zeicola</i> (anamorph: <i>Diplodia frumenti</i>)
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria and fungi
	Pyrenopeziza stalk rot and root rot	<i>Phoma terrestris</i> = <i>Pyrenopeziza terrestris</i>
	Pythium root rot	<i>Pythium spp.</i> , <i>P. arrhenomanes</i> , <i>P. graminicola</i>
	Pythium stalk rot	<i>Pythium aphanidermatum</i> = <i>P. butleri</i> L.
	Red kernel disease (ear mold, leaf and seed rot)	<i>Epicoccum nigrum</i>
	Rhizoctonia ear rot (sclerotial rot)	<i>Rhizoctonia zae</i> (teleomorph: <i>Waitea circinata</i>)
	Rhizoctonia root rot and stalk rot	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Rhizoctonia zae</i>

Erkrankung	Pathogen
Root rots, minor	Alternaria alternata, Cercospora sorghi, Dictyochaeta fertilis, Fusarium acuminatum (teleomorph: Gibberella acuminata), F. equiseti (teleomorph: G. intricans), F. oxysporum, F. pallidoroseum, F. poae, F. roseum, G. cyanogena, (anamorph: F. sulphureum), Microdochium bolleyi, Mucor sp., Periconia circinata, Phytophthora cactorum, P. drechsleri, P. nicotianae var. parasitica, Rhizopus arrhizus
Rostratum leaf spot (<i>Helminthosporium</i> leaf disease, ear and stalk rot)	Setosphaeria rostrata, (anamorph: Exserohilum rostratum = He/minthosporium rostratum)
Rust, common corn	Puccinia sorghi
Rust, southern corn	Puccinia polysora
Rust, tropical corn	Physopella pallescens, P. zae = Angiopsora zae
Sclerotium ear rot (southern blight)	Sclerotium rolfsii Sacc. (teleomorph: Athelia rolfsii)
Seed rot-seedling blight	Bipolaris sorokiniana, B. zeicola = Helminthosporium carbonum, Diplodia maydis, Exserohilum pedicillatum, Exserohilum turcicum = Helminthosporium turcicum, Fusarium avenaceum, F. culmorum, F. moniliforme, Gibberella zae (anamorph: F. graminearum), Macrohomina phaseolina, Penicillium spp., Phomopsis sp., Pythium spp., Rhizoctonia solani, R. zae, Sclerotium rolfsii, Spicaria sp.
Selenophoma leaf spot	Selenophoma sp.
Sheath rot	Gaeumannomyces graminis
Shuck rot	Myrothecium gramineum
Silage mold	Monascus purpureus, M. ruber
Smut, common	Ustilago zae = U. maydis
Smut, false	Ustilaginoidea virens
Smut, head	Sphacelotheca reiliana = Sporisorium holcisorghi
Southern corn leaf blight and stalk rot	Cochliobolus heterostrophus (anamorph: Bipolaris maydis = Helminthosporium maydis)
Southern leaf spot	Stenocarpella macrospora = Diplodia macrospora

	Erkrankung	Pathogen
5	Stalk rots, minor	Cercospora sorghi, Fusarium episphaeria, F. merismoides, F. oxysporum Schlechtend, F. poae, F. roseum, F. solani (teleomorph: Nectria haematoxocca), F. tricinctum, Mariannaea elegans, Mucor sp., Rhopographus zaeae, Spicaria sp.
10	Storage rots	Aspergillus spp., Penicillium spp. and other fungi
10	Tar spot	Phyllachora maydis
15	Trichoderma ear rot and root rot	Trichoderma viride = T. lignorum teleomorph: Hypocreia sp.
15	White ear rot, root and stalk rot	Stenocarpella maydis = Diplodia zeae
20	Yellow leaf blight	Ascochyta ischaemi, Phyllosticta maydis (teleomorph: Mycosphaerella zeae-maydis)
	Zonate leaf spot	Gloeocercospora sorghi

20

Besonders bevorzugt sind

- Plasmodiophoromycota wie Plasmodiophora brassicae (Kohlhernie, clubroot of crucifers), Spongospora subterranea (powdery scab of potato tubers), Polymyxa graminis (root disease of cereals and grasses),
- Oomycota wie Bremia lactucae (Falscher Mehltau an Salat), Peronospora (Falscher Mehltau) bei snapdragon (P. antirrhini), Zwiebel (P. destructor), Spinat (P. effusa), Sojabohne (P. manchurica), Tabak ("blue mold" = Blauschimmel; P. tabacina) Alfalfa und Klee (P. trifolii), Pseudoperonospora humuli (Falscher Mehltau an Hopfen), Plasmopara (Falscher Mehltau bei Trauben) (P. viticola) und Sonnenblume (P. halstedii), Sclerotinia macrospora (Falscher Mehltau bei Cerealien und Gäsern), Pythium (seed rot, seedling damping-off, and root rot and all types of plants, z.B. Wurzelbrand an Beta-Rübe durch P. debaryanum), Phytophthora infestans (Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel, Braunfäule bei Tomate etc.), Albugo spec. (white rust on cruciferous plants).
- Ascomycota wie Microdochium nivale (Schneeschimmel an Roggen und Weizen), Fusarium graminearum, Fusarium culmorum (Ährenfäule v.a. bei Weizen), Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f.sp. hordei) und Weizen (f.sp. tritici)), Erysiphe pisi (Erbsen-

mehltau), *Nectria galligena* (Obstbaumkrebs), *Unicnula necator* (Echter Mehltau der Weinrebe), *Pseudopeziza tracheiphila* (Roter Brenner der Weinrebe), *Claviceps purpurea* (Mutterkorn an z.B. Roggen und Gräsern), *Gaeumannomyces graminis* (Schwarzbeinigkeit an Weizen, Roggen u.a. Gräsern), *Magnaporthe grisea* (rice blast disease), *Pyrenophora graminea* (Streifenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora teres* (Netzfleckenkrankheit an Gerste), *Pyrenophora tritici-repentis* (Blattfleckenkrankheit (Blattdürre) an Weizen), *Venturia inaequalis* (Apfelschorf), *Sclerotinia sclerotiorum* (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), *Pseudopeziza medicaginis* (Klappenschorf an Luzerne, Weiß- und Rotklee).

- Basidiomyceten wie *Typhula incarnata* (Typhula-Fäule an Gerste, Roggen, Weizen), *Ustilago maydis* (Beulenbrand an Mais), *Ustilago nuda* (Flugbrand an Gerste), *Ustilago tritici* (Flugbrand an Weizen, Dinkel), *Ustilago avenae* (Flugbrand an Hafer), *Rhizoctonia solani* (Wurzeltöter an Kartoffeln), *Sphacelotheca* spp. (head smut of sorghum), *Melampsora lini* (rust of flax), *Puccinia graminis* (Schwarzrost an Weizen, Gerste, Roggen, Hafer), *Puccinia recondita* (Braunrost an Weizen), *Puccinia dispersa* (Braunrost an Roggen), *Puccinia hordei* (Braunrost an Gerste), *Puccinia coronata* (Kronenrost an Hafer), *Puccinia striiformis* (Gelbrost an Weizen, Gerste, Roggen sowie zahlreichen Gräsern), *Uromyces appendiculatus* (Bohnenrost), *Sclerotium rolfsii* (root and stem rots of many plants).

- Deuteromyceten (Fungi imperfecti) wie *Septoria nodorum* (Spelzenbräune) an Weizen (*Septoria tritici*), *Pseudocercospora herpotrichoides* (Halmbruchkrankheit an Weizen, Gerste, Roggen), *Rynchosporium secalis* (Blattfleckenkrankheit an Roggen und Gerste), *Alternaria solani* (Dürrfleckenkrankheit an Kartoffel, Tomate), *Phoma betae* (Wurzelbrand an Beta-Rübe), *Cercospora beticola* (Cercospora-Blattfleckenkrankheit an Beta-Rübe), (*Alternaria brassicae* (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), *Verticillium dahliae* (Rapswelke und -stengelfäule), *Colletotrichum lindemuthianum* (Brennfleckenkrankheit an Bohne), *Phoma lingam* - Umfallkrankheit (Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps), *Botrytis cinerea* (Grauschimmel an Weinrebe, Erdbeere, Tomate, Hopfen etc.).

Am meisten bevorzugt sind *Phytophthora infestans* (Kraut- und Knollenfäule, Braunfäule bei Tomate etc.), *Microdochium nivale* (vormals *Fusarium nivale*; Schneeschimmel an Roggen und Weizen), *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* (Ährenfäule an Weizen),

Fusarium oxysporum (Fusarium-Welke an Tomate), Blumeria graminis (Echter Mehltau an Gerste (f. sp. hordei) und Weizen (f. sp. tritici)), Magnaporthe grisea (rice blast disease), Sclerotinia sclerotium (Weißstengeligkeit, Rapskrebs), Septoria nodorum und 5 Septoria tritici (Spelzenbräune an Weizen), Alternaria brassicae (Rapsschwärze an Raps, Kohl u.a. Kreuzblüttern), Phoma lingam (Umfallkrankheit, Schwarzbeinigkeit an Kohl; Wurzelhals- oder Stengelfäule an Raps).

10 2. Bakterielle Pathogene:

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 3 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

15

Tabelle 3: Bakterielle Erkrankungen

	Erkrankung	Pathogen
20	Bacterial leaf blight and stalk rot	Pseudomonas avenae subsp. avenae
	Bacterial leaf spot	Xanthomonas campestris pv. holcicola
	Bacterial stalk rot	Enterobacter dissolvens = Erwinia dissolvens
25	Schwarzbeinigkeit ("Bacterial stalk and top rot")	Erwinia carotovora subsp. carotovora, Erwinia chrysanthemi pv. zeae
	Bacterial stripe	Pseudomonas andropogonis
	Chocolate spot	Pseudomonas syringae pv. coronafaciens
30	Goss's bacterial wilt and blight (leaf freckles and wilt)	Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis = Corynebacterium michiganense pv. andnebraskense
	Holcus spot	Pseudomonas syringae pv. syringae
	Purple leaf sheath	Hemiparasitic bacteria
35	Seed rot-seedling blight	Bacillus subtilis
	Stewart's disease (bacterial wilt)	Pantoea stewartii = Erwinia stewartii
40	Corn stunt (achapparramiento, maize stunt, Mesa Central or Rio Grande maize stunt)	Spiroplasma kunkelii

Ganz besonders bevorzugt sind nachfolgende pathogene Bakterien:
 45 Corynebacterium sepedonicum (Bakterienringfäule an Kartoffel), Erwinia carotovora (Schwarzbeinigkeit an Kartoffel), Erwinia amylovora (Feuerbrand an Birne, Apfel, Quitte), Streptomyces

scabies (Kartoffelschorf), *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wildfeuer an Tabak), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Fettfleckenkrankheit an Buschbohne), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ("bacterial speck" an Tomate), *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Blattfleckenkrankheit an Baumwolle) und *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Bakterienfäule an Reis und anderen Gräsern).

3. Virale Pathogene:

10

"Virale Pathogene" schließt sämtliche Pflanzenviren ein wie beispielsweise Tabak- oder oder Cucumber-Mosaiv Virus, Ringspot-Virus, Nekrose-Virus, Mais Dwarf-Mosaic Virus etc.

15

Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 4 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

Tabelle 4: Virale Erkrankungen

20

Krankheit	Pathogen
American wheat stripe (wheat stripe mosaic)	American wheat stripe mosaic virus (AWSMV)
Barley stripe mosaic	Barley stripe mosaic virus (BSMV)
Barley yellow dwarf	Barley yellow dwarf virus (BYDV)
Brome mosaic	Brome mosaic virus (BMV)
Cereal chlorotic mottle	Cereal chlorotic mottle virus (CCMV)
Corn chlorotic vein banding (Brazilian maize mosaic)	Corn chlorotic vein banding virus (CCBV)
Corn lethal necrosis	Viruskomplex aus Maize chlorotic mottle virus (MCMV) und Maize dwarf mosaic virus (MDMV) A oder B oder Wheat streak mosaic virus (WSMV)
Cucumber mosaic	Cucumber mosaic virus (CMV)
Cynodon chlorotic streak	Cynodon chlorotic streak virus (CCSV)
Johnsongrass mosaic	Johnsongrass mosaic virus (JGMV)
Maize bushy stunt	Mycoplasma-like organism (MLO) associated
Maize chlorotic dwarf	Maize chlorotic dwarf virus (MCDV)
Maize chlorotic mottle	Maize chlorotic mottle virus (MCMV)
Maize dwarf mosaic	Maize dwarf mosaic virus (MDMV) strains A, D, E and F
Maize leaf fleck	Maize leaf fleck virus (MLFV)
Maize line	Maize line virus (MLV)

	Krankheit	Pathogen
	Maize mosaic (corn leaf stripe, enanismo rayado)	Maize mosaic virus (MMV)
5	Maize mottle and chlorotic stunt	Maize mottle and chlorotic stunt virus
	Maize pellucid ringspot	Maize pellucid ringspot virus (MPRV)
	Maize raya gruesa	Maize raya gruesa virus (MRGV)
10	maize rayado fino (fine striping disease)	Maize rayado fino virus (MRFV)
	Maize red leaf and red stripe	Mollicute
	Maize red stripe	Maize red stripe virus (MRSV)
	Maize ring mottle	Maize ring mottle virus (MRMV)
15	Maize rio IV	Maize rio cuarto virus (MRCV)
	Maize rough dwarf (nanismo ruvido)	Maize rough dwarf virus (MRDV) (Cereal tillering disease virus)
	Maize sterile stunt	Maize sterile stunt virus (strains of barley yellow striate virus)
20	Maize streak	Maize streak virus (MSV)
	Maize stripe (maize chlorotic stripe, maize hoja blanca)	Maize stripe virus
	Maize stunting	Maize stunting virus
25	Maize tassel abortion	Maize tassel abortion virus (MTAV)
	Maize vein enation	Maize vein enation virus (MVEV)
	Maize wallaby ear	Maize wallaby ear virus (MWEV)
	Maize white leaf	Maize white leaf virus
30	Maize white line mosaic	Maize white line mosaic virus (MWLMV)
	Millet red leaf	Millet red leaf virus (MRLV)
	Northern cereal mosaic	Northern cereal mosaic virus (NCMV)
	Oat pseudorosette (zakuklivanie)	Oat pseudorosette virus
35	Oat sterile dwarf	Oat sterile dwarf virus (OSDV)
	Rice black-streaked dwarf	Rice black-streaked dwarf virus (RBSDV)
	Rice stripe	Rice stripe virus (RSV)
40	Sorghum mosaic	Sorghum mosaic virus (SrMV) (auch: sugarcane mosaic virus (SCMV) Stämme H, I and M)
	Sugarcane Fiji disease	Sugarcane Fiji disease virus (FDV)
	Sugarcane mosaic	Sugarcane mosaic virus (SCMV) strains A, B, D, E, SC, BC, Sabi and MB (formerly MDMV-B)
45	Wheat spot mosaic	Wheat spot mosaic virus (WSMV)

4. Tierische Schädlinge

4.1 Insekten Pathogene:

5 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien Insekten wie beispielsweise Käfer, Raupen, Läuse oder Milben zu nennen. Bevorzugt sind Insekten der Gattungen Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Mallophaga, Homoptera, Hemiptera, Orthoptera, Thysanoptera, Dermaptera, Isoptera, Anoplura, Siphonaptera, Trichoptera, etc.. Besonders bevorzugt sind Coleoptera and Lepidoptera Insekten, wie beispielsweise den Maiszünsler (European Corn Borer (ECB)), *Diabrotica barberi* ("northern corn rootworm"), *Diabrotica undecimpunctata* ("southern corn rootworm"), *Diabrotica virgifera* ("Western corn rootworm"), *Agrotis ipsilon* ("black cutworm"), *Crymodes devastator* ("glassy cutworm"), *Feltia ducens* ("dingy cutworm"), *Agrotis gladiaria* ("claybacked cutworm"), *Melanotus* spp., *Aeolus mellillus* ("wireworm"), *Aeolus mancus* ("wheat wireworm"), *Horistonotus uhlerii* ("sand wireworm"), *Sphenophorus maidis* ("maize billbug"), *Sphenophorus zeae* ("timothy billbug"), *Sphenophorus parvulus* ("bluegrass billbug"), *Sphenophorus callosus* ("southern corn billbug"), *Phyllophaga* spp. ("white grubs"), *Anuraphis maidiradicis* ("corn root aphid"), *Delia platura* ("seedcorn maggot"), *Colaspis brunnea* ("grape colaspis"), *Stenolophus lecontei* ("seedcorn beetle") und *Clivinia impressifrons* ("lender seedcorn beetle").

30 Ferner sind zu nennen: Das Getreidehähnchen (*Oulema melanopus*), die Fritfliege (*Oscinella frit*), Drahtwürmer (*Agrotis lineatus*) und Blattläuse (wie z.B. Haferblattlaus *Rhopalosiphum padi*, Große Getreideblattlaus *Sitobion avenae*).

4.2 Nematoden:

35 Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die in Tabelle 6 genannten Pathogene und die mit ihnen in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen zu nennen.

40 Tabelle 6: Parasitäre Nematoden

Schädigung	Pathogene Nematode
Awl	<i>Dolichodorus</i> spp., <i>D. heterocephalus</i>
45 Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen ("Bulb and stem"; Europe)	<i>Ditylenchus dipsaci</i>
Burrowing	<i>Radopholus similis</i>

	Schädigung	Pathogene Nematode
	Haferzystenälchen ("Cyst")	Heterodera avenae, H. ziae, Punctodera chalcoensis
5	Dagger	Xiphinema spp., X. americanum, X. mediterraneum
	False root-knot	Nacobbus dorsalis
	Lance, Columbia	Hoplolaimus columbus
	Lance	Hoplolaimus spp., H. galeatus
10	Lesion	Pratylenchus spp., P. brachyurus, P. crenatus, P. hexincisus, P. neglectus, P. penetrans, P. scribneri, P. thornei, P. ziae
	Needle	Longidorus spp., L. breviannulatus
15	Ring	Criconemella spp., C. ornata
	Wurzelgallenälchen ("Root-knot")	Meloidogyne spp., M. chitwoodi, M. incognita, M. javanica
	Spiral	Helicotylenchus spp.
	Sting	Belonolaimus spp., B. longicaudatus
20	Stubby-root	Paratrichodorus spp., P. christiei, P. minor, Quinisulcius acutus, Trichodorus spp.
	Stunt	Tylenchorhynchus dubius

25

Ganz besonders bevorzugt sind *Globodera rostochiensis* und *G. pallida* (Zystenälchen an Kartoffel, Tomate u.a. Nachtschattengewächsen), *Heterodera schachtii* (Rübenzystenälchen an Zucker- und Futterrübe, Raps, Kohl etc.), *Heterodera avenae* (Haferzystenälchen an Hafer u.a. Getreidearten), *Ditylenchus dipsaci* (Stengel- oder Stockälchen, Rübenkopfälchen an Roggen, Hafer, Mais, Klee, Tabak, Rübe), *Anguina tritici* (Weizenälchen, Radekrankheit an Weizen (Dinkel, Roggen), *Meloidogyne hapla* (Wurzelgallenälchen an Möhre, Gurke, Salat, Tomate, Kartoffel, Zuckerrübe, Luzerne).

Als für die einzelnen Sorten bevorzugte Pilz- oder Virus-Pathogene sind beispielsweise zu nennen:

40 1. Gerste:

Pilz-, bakterielle und virale Pathogene: *Puccinia graminis* f.sp. *hordei* (barley stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *hordei* (Barley Powdery Mildew), barley yellow dwarf virus (BYDV),

Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Schizaphis graminum* (greenbug); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Euschistus servus* (brown stink bug); *Deliaplatura* (seedcorn maggot); *Mayetiola destructor* (Hessian fly); *Petrobia latens* (brown wheat mite).

5 2. Sojabohne:

10 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Phytophthora megasperma* fsp.*glycinea*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* (*Phomopsis sojae*), *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Cercospora kikuchii*, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*, *Colletotrichum dematium* (*Colletotrichum truncatum*), *Corynespora cassiicola*, *Septoria glycines*, *Phyllosticta sojicola*, *Alternaria alternata*, *Pseudomonas syringae* p.v. *glycinea*, *Xanthomonas campestris* p.v. *phaseoli*, *Microsphaera diffusa*, *Fusarium semitectum*, *Phialophora gregata*, Sojabohnen Mosaikvirus, *Glomerella glycines*, Tobacco Ring spot virus, Tobacco Streak virus, *Phakopsorapachyrhizi*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum*, *Pythium debaryanum*, Tomato spotted wilt virus, *Heterodera glycines* *Fusarium solani*.

15 25 Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudoplusia includens* (soybean looper); *Anticarsia gemmatalis* (velvetbean caterpillar); *Plathypena scabra* (green cloverworm); *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Spodoptera exigua* (beet armyworm); *Heliothis virescens* (cotton budworm); *Helicoverpa zea* (cotton bollworm); *Epilachna varivestis* (Mexican bean beetle); *Myzus persicae* (green peach aphid); *Empoasca fabae* (potato leaf hopper); *Acrosternum hilare* (green stink bug); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus differentialis* (differential grasshopper); *Hylemya platura* (seedcom maggot); *Sericothrips variabilis* (soybean thrips); *Thrips tabaci* (onion thrips); *Tetranychus turkestanicus* (strawberry spider mite); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite);

30 35 40 3. Canola:

45 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Albugo candida*, *Alternaria brassicacearum*, *Leptosphaeria maculans*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella brassicicola*, *Pythium ultimum*, *Peronospora parasitica*, *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata*.

4. Alfalfa:

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Clavibacter michiganense* subsp. *insidiosum*, *Pythium ultimum*, *Pythium irregularis*, *Pythium splendens*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora megasperma*, *Peronospora trifoliorum*, *Phoma medicaginis* var. *medicaginis*, *Cercospora medicaginis*, *Pseudopeziza medicaginis*, *Leptotrichila medicaginis*, *Fusarium*, *Xanthomonas campestris* p.v. *alfalfae*, *Aphanomyces euteiches*, *Stemphylium herbarum*, *Stemphylium alfalfae*.

5. Weizen:

15 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Pseudomonas syringae* p.v. *atrofaciens*, *Urocystis agropyri*, *Xanthomonas campestris* p.v. *translucens*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Ustilago tritici*, *Ascochyta tritici*, *Cephalosporium gramineum*, *Collotetrichum graminicola*, *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *Puccinia striiformis*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Septoria nodorum*, *Septoria tritici*, *Septoria avenae*, *Pseudocercosporella herpotrichoides*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia cerealis*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium ultimum*, *Bipolaris sorokiniana*, Barley Yellow Dwarf Virus, Brome Mosaic Virus, Soil Borne Wheat Mosaic Virus, Wheat Streak Mosaic Virus, Wheat Spindle Streak Virus, American Wheat Striate Virus, *Claviceps purpurea*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Ustilago tritici*, *Tilletia indica*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium arrhenomanes*, *Pythium gramicola*, *Pythium aphanidermatum*, High Plains Virus, European wheat striate virus, *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* (Wheat stem rust), *Blumeria* (*Erysiphe*) *graminis* f.sp. *tritici* (Wheat Powdery Mildew)

Pathogene Insekten / Nematoden: *Pseudaletia unipunctata* (army worm); *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Agrotis orthogonia* (western cutworm); *Elasmopalpus Zignosellus* (lesser cornstalk borer); *Oulema melanopus* (cereal leaf beetle); *Hypera punctata* (clover leaf weevil); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); Russian wheat aphid; *Schizaphis graminum* (greenbug); *Macrosiphum avenae* (English grain aphid); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper);

Melanoplus differentialis (differential grasshopper);
Melanoplus sanguinipes (migratory grasshopper); Mayetiola
destructor (Hessian fly); Sitodiplosis mosellana (wheat
midge); Meromyza americana (wheat stem maggot); Hylemya
coarctata (wheat bulb fly); Frankliniella fusca (tobacco
thrips); Cephus cinctus (wheat stem sawfly); Aceria tulipae
(wheat curl mite);

6. Sonnenblume:

10

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Plasmophora
halstedii, Sclerotinia sclerotiorum, Aster Yellows, Septoria
helianthi, Phomopsis helianthi, Alternaria helianthi, Alter-
naria zinniae, Botrytis cinerea, Phoma macdonaldii, Macro-
phomina phaseolina, Erysiphe cichoracearum, Rhizopus oryzae,
Rhizopus arrhizus, Rhizopus stolonifer, Puccinia helianthi,
Verticillium dahliae, Erwinia carotovorum p.v. Carotovora,
Cephalosporium acremonium, Phytophthora cryptogea, Albugo
tragopogonis.

20

Pathogene Insekten / Nematoden: Suleima helianthana (sun-
flower bud moth); Homoeosoma electellum (sunflower moth);
zygogramma exclamationis (sunflower beetle); Bothyrus
gibbosus (carrot beetle); Neolasioptera murtfeldtiana
(sunflower seed midge);

25

7. Mais:

30

Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: Fusarium monili-
forme var. subglutinans, Erwinia stewartii, Fusarium monili-
forme, Gibberella zeae (Fusarium graminearum), Stenocarpella
maydi (Diplodia maydis), Pythium irregularare, Pythium debarya-
num, Pythium graminicola, Pythium splendens, Pythium ultimum,
Pythium aphanidermatum, Aspergillus flavus, Bipolaris maydis
0, T (Cochliobolus heterostrophus), Helminthosporium carbonum
I, II & III (Cochliobolus carbonum), Exserohilum turcicum I,
II & III, Helminthosporium pedicellatum, Physoderma maydis,
Phyllosticta maydis, Kabatiella maydis, Cercospora sorghi,
Ustilago maydis, Puccinia sorghi, Puccinia polysora, Macro-
phomina phaseolina, Penicillium oxalicum, Nigrospora oryzae,
Cladosporium herbarum, Curvularia lunata, Curvularia inae-
qualis, Curvularia pallens, Clavibacter michiganense subsp.
nebrascense, Trichoderma viride, Maize Dwarf Mosaic Virus A
& B, Wheat Streak Mosaic Virus, Maize Chlorotic Dwarf Virus,
Claviceps sorghi, Pseudonomas avenae, Erwinia chrysanthemi
p.v. Zea, Erwinia carotovora, Cornstunt spiroplasma, Diplodia
macrospora, Sclerophthora macrospora, Peronosclerospora

40

45

5 sorghi, *Peronosclerospora philippinensis*, *Peronosclerospora maydis*, *Peronosclerospora sacchari*, *Spacelotheca reiliana*, *Physopella zae*, *Cephalosporium maydis*, *Cephalosporium acremonium*, Maize Chlorotic Mottle Virus, High Plains Virus, Maize Mosaic Virus, Maize Rayado Fino Virus, Maize Streak Virus (MSV, Maisstrichel-Virus), Maize Stripe Virus, Maize Rough Dwarf Virus.

10 Pathogene Insekten / Nematoden: *Ostrinia nubilalis* (European corn borer); *Agrotis ipsilon* (black cutworm); *Helicoverpa zea* (corn earworm); *Spodoptera frugiperda*. (fall armyworm); *Diatraea grandiosella* (southwestern corn borer); *Elasmopalpus lignosellus* (lesser cornstalk borer); *Diatraea saccharalis* (surgarcane borer); *Diabrotica virgifera* (western corn rootworm); *Diabrotica longicornis barberi* (northern corn rootworm); *Diabrotica undecimpunctata howardi* (southern corn rootworm); *Melanotus spp.* (wireworms); *Cyclocephala borealis* (northern masked chafer; white grub); *Cyclocephala immaculata* (southern masked chafer; white grub); *Popillia japonica* (Japanese beetle); *Chaetocnema pulicaria* (corn flea beetle); *Sphenophorus maidis* (maize billbug); *Rhopalosiphum maidis* (corn leaf aphid); *Anuraphis maidiradicis* (corn root aphid); *Blissus leucopterus leucopterus* (chinch bug); *Melanoplus femur-rubrum* (redlegged grasshopper); *Melanoplus sanguinipes* (migratory grasshopper); *Hylemya platura* (seedcorn maggot); *Agromyza parvicornis* (corn blot leafminer); *Anaphothrips obscurus* (grass thrips); *Solenopsis milesta* (thief ant); *Tetranychus urticae* (twospotted spider mite).

30 8. Sorghum:

35 Pilz-, bakterielle oder virale Pathogene: *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*), *Cercospora sorghi*, *Gloeocercospora sorghi*, *Ascochyta sorghina*, *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*, *Xanthomonas campestris* p.v. *holcicola*, *Pseudomonas andropogonis*, *Puccinia purpurea*, *Macrophomina phaseolina*, *Perconia circinata*, *Fusarium moniliforme*, *Alternaria alternate*, *Bipolaris sorghicola*, *Helminthosporium sorghicola*, *Curvularia lunata*, *Phoma insidiosa*, *Pseudomonas avenae* (*Pseudomonas alboprecipitans*), *Ramulispora sorghi*, *Ramulispora sorghicola*, *Phyllachara sacchari*, *Sporisorium reilianum* (*Sphacelotheca reiliana*), *Sphacelotheca cruenta*, *Sporisorium sorghi*, Sugarcane mosaic H, Maize Dwarf Mosaic Virus A & B, *Claviceps sorghi*, *Rhizoctonia solani*, *Acremonium strictum*, *Sclerotophthora macrospora*, *Peronosclerospora sorghi*, *Peronosclerospora philippinensis*,

Sclerospora graminicola, Fusarium graminearum, Fusarium oxysporum, Pythium arrhenomanes, Pythium graminicola.

Pathogene Insekten / Nematoden: Chilo partellus (sorghum borer); Spodoptera frugiperda (fall armyworm); Helicoverpa zea (corn ear-worm); Elasmopalpus lignosellus (lesser corn-stalk borer); Feltia subterranea (granulate cutworm); Phyllophaga crinita (white grub); Eleodes, Conoderus und Aeolus spp. (wireworm); Oulema melanopus (cereal leaf beetle); Chaetocnema pulicaria (corn flea beetle); Sphenophorus maidis (maize billbug); Rhopalosiphum maidis (corn leaf aphid); Siphaphlava (yellow sugarcane aphid); Blissus leucopterus leucopterus (chinch bug); Contarinia sorghicola (sorghum-midge); Tetranychus cinnabarinus (carmine spider mite); Tetranychus urticae (two spotted spider mite).

9. Baumwolle:

Pathogene Insekten / Nematoden: Heliothis virescens (cotton budworm); Helicoverpa zea (cotton bollworm); Spodoptera exigua (beet armyworm); Pectinophora gossypiella (pink bollworm); Anthonomus grandis grandis (boll weevil); Aphis gossypii (cotton aphid); Pseudatomoscelis seriatus (cotton fleahopper); Trialeurodes abutilonea (bandedwinged whitefly); Lygus lineolaris (tarnished plant bug); Melanoplus femur-rubrum (redlegged grasshopper); Melanoplus differentialis (differential grasshopper); Thrips tabaci (onion thrips); Frankliniella fusca (tobacco thrips); Tetranychus cinnabarinus (carmine spider mite); Tetranychus urticae (two-spotted spider mite);

10. Reis:

Pathogene Insekten / Nematoden: Diatraea saccharalis (sugarcane borer); Spodoptera frugiperda (fall armyworm); Helicoverpa zea (corn earworm); Colaspis brunnea (grape colaspis); Lissorhoptrus oryzophilus (rice water weevil); Sitophilus oryzae (rice weevil); Nephotettix nigropictus (rice leafhopper); Blissus Ieucopterus leucopterus (chinch bug); Acrosternum hilare (green stink bug);

11. Raps:

Pathogene Insekten / Nematoden: Brevicoryne brassicae (cabbage aphid); Phylotreta cruciferae (Flea beetle); Mamestra configurata (Bertha armyworm); Plutella xylostella (Diamond-back moth); Delia ssp. (Root maggots).

"NADPH-Oxidase" meint im Rahmen der Erfindung all solche Enzyme, die als wesentliche Eigenschaft befähigt sind mittels eines Einzelelektronentransfers molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. Bevorzugt sind die Enzyme die durch die EC-5 Klasse E.C.1.23.45.3 beschrieben werden. Dabei kann die NADPH-Oxidasen aus einem oder mehr Polypeptiden bestehen, die gleich oder unterschiedlich sein können.

Bevorzugt ist die NADPH-Oxidase ein Flavocytochromprotein und 10 umfasst als prosthetische Gruppen ein Cytochrom b und/oder eine FAD Einheit. Die NADPH-Oxidase kann aus einem $\alpha\beta\gamma$ Heterodimer bestehen, wobei die β Untereinheit die funktionelle Untereinheit des Flavocytochroms darstellen und als Glykoprotein die Elektronentransportkomponenten umfassen kann (eine hydrophile, zytosolische, C-terminale Domäne, welche NADPH und FAD enthält, sowie 15 4 bis 6 N-terminale, putative Transmembrane- α -Helixen, welche zwei Histidin-komplexierte prosthetische Haem-Gruppen enthält). Die α -Untereinheit kann eine C-terminale, Prolin-reiche Sequenz umfassen, welche potentielle zytosolische, aktivierende Faktoren 20 der NADPH-Oxidase zu binden vermag. Durch die Bindung der zytosolischen phox Proteine (z.B. p47-phox, p67-phox, p40-phox) und p21rac - ein GTP-bindendes Protein - kann Aktivierung erfolgen.

Dem Fachmann sind zahlreiche NADPH-Oxidasen aus pflanzlichen 25 Organismen bekannt (u.a. Torres MA et al. (1998) Plant J 14: 365-370). Beispielhaft jedoch nicht einschränkend seien die Sequenzen mit nachfolgenden GenBnk Acc.-No. zu nennen: AJ251717 (Hordeum vulgare), AP003560 (Oryza sativa var. japonica), AJ320505 (Nicotiana tabacum), AB050660 (Solanum tuberosum), 30 AF088276 (Lycopersicon esculentum), AB008111 (Arabidopsis thaliana; Atrboh F), AF055357 (Arabidopsis thaliana; RbohD), AJ309006 (Nicotiana tabacum; rboh), AP003271 (Oryza sativa cv. japonica), AF055355 (Arabidopsis thaliana; RbohC), AF055353 (Arabidopsis thaliana; RbohA). Insbesondere bevorzugt sind die NADPH-35 OXIDASEN, die eine Sequenz gemäß SEQ ID: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 umfassen.

Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offenbarten NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen können z.B. 40 durch Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken - unter Verwendung der NADPH-Oxidase Sequenzen als Suchsequenz bzw. Sonder - leicht aufgefunden werden. Beispielhaft seien dabei Sequenzen mit nachfolgenden GenBnk Acc.-No. zu nennen: CAC51517.1, AJ251717, T03973, BAB68079.1, AP003560, T02024, CAC87256.1, 45 AJ320505, BAB70750.1, AB050660, AF088276_1, NP_564821.1, M_105079, T00265 AC007764_16, NP_192862.1, NM_117194, AF147783_1, AAM28891.1, AF506374, CAC84140.1, AJ309006, T51804, NP_199602.1,

NM_124165, BAB89740.1, AP003271, AAC39477.1, AF055355,
NP_199919.1, NM_124485, AAC39475.1, AF055353, NP_196356.1,
NM_120821, NP_194239.1, NM_118641, BAB08369.1, AB015475,
AAC39478.1, AF055356, AC069143_9, NP_173357.1, NM_101781,
5 NP_172383.1, NM_100780, AAB70398.1, AC000106, AAC39476.1,
AF055354, BAB70751.1, AB050661, BAB63664.1, AP003275, AAD24966.1,
AF109150.

Besonders bevorzugt umfasst die Polypeptidsequenz der NADPH-
10 Oxidase mindestens ein Sequenzmotiv ausgewählt aus der Gruppe
von Sequenzmotiven bestehend aus

- i) AL (K/R) GL (K/R)
- ii) DK (N/D) XDG (R/K) (I/L/V) (T/N) E
- 15 iii) LSASAN
- iv) IMEELDP
- v) K(F/L)NMA(I/L)(I/V)LXPVCRN
- vi) (E/Q)WHPFSIT
- vii) S(A/S)PXDD(Q/Y)(L/I)S(I/V)H(V/I/L)R
- 20 viii) DGPYG(S/A)PAGDY
- ix) L(I/V)GLGIGATP
- x) FYWVTREQGSF
- xi) GVFYCG

25 Ganz besonders bevorzugt enthält die Peptidsequenz mindestens 2
oder 3, ganz besonders bevorzugt mindestens 4 oder 5, am meisten
bevorzugt alle der Sequenzmotive ausgewählt aus der Gruppe der
Sequenzmotive i), ii), iii), iv), v), vi), vii), viii), ix) x)
und xi). (Angaben in Klammern meinen alternativ mögliche Amino-
30 säuren an dieser Position; z.B. mein (V/I), dass an dieser
Position Valin oder Isoleucin möglich ist).

NADPH-Oxidase kann aber auch jede andere Einheit eines NADPH-
Oxidase Enzymkomplexes meinen der wesentlich für Aktivität der
35 NADPH-Oxidase ist.

"Proteinmenge" meint die Menge eines NADPH-Oxidase-Polypeptides
in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zell-
kompartiment. "Verminderung" der Proteinmenge meint die mengen-
40 mäßige Verminderung der Menge einer NADPH-Oxidase in einem
Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment
- beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren -
im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den
dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen
45 Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter
der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens
10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders

bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

5 "Aktivität" meint die Fähigkeit einer NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff (O_2) zu Superoxid (O_2^-) umzusetzen. "Verminderung" der Aktivität meint die Verminderung der Gesamt-Aktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines

10 der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens

15 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %.

"Funktion" meint bevorzugt die Substratbindekapazität einer

20 NADPH-Oxidase in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment. Als Substrate kommen niedermolekulare Verbindungen wie NADPH oder FAD aber auch die Proteininteraktionspartner einer NADPH-Oxidase in Frage.

25 "Verminderung" der Funktion meint beispielsweise die mengenmäßige Verminderung der Bindekapazität oder Bindestärke einer NADPH-Oxidase zu mindestens einem Substrat in einem Organismus, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment - beispielsweise durch eines der unten beschriebenen Verfahren - im Vergleich zu

30 dem Wildtyp derselben Gattung und Art auf den dieses Verfahren nicht angewendet wurde, unter ansonst gleichen Rahmenbedingungen (wie beispielsweise Kulturbedingungen, Alter der Pflanzen etc.). Unter Verminderung ist auch die Veränderung der Substratspezifität zu verstehen, wie sie beispielsweise durch den k_{cat}/K_m -Wert

35 ausgedrückt werden kann. Der Verminderung beträgt dabei mindestens 10 %, bevorzugt mindestens 10 % oder mindestens 20 %, besonders bevorzugt um mindestens 40 % oder 60 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 70 % oder 80 %, am meisten bevorzugt um mindestens 90 % oder 95 %. Bindepartner für NADPH-Oxidase können

40 beispielsweise durch das Hefe-2-Hybridsystem in der dem Fachmann geläufigen Weise identifiziert werden.

Verfahren zur Bestimmung der Proteinmenge, der Aktivität von NADPH Oxidasen oder der Substratbindekapazität sind dem Fachmann

45 bekannt. Beispielsweise kann die NADPH abhängige, DPI-inhibierbare O_2^- oder H_2O_2 Produktion (z.B. über Nitro-Blau-Tetrazolium [NBT] oder Cytochrom c Reduktion) gemessen werden. Die Protein-

menge kann beispielsweise immunologisch unter Verwendung entsprechender Antikörper bestimmt werden. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Yu L et al. (1999) Blood 94(7):2497-504; Doke N (1983a) Physiol Plant Pathol 23:345-357; Levine A et al. (1994)

5 Cell 79:583-593; Tenhaken R et al. (1995) Proc Nat Acad Sci USA 92: 4158-4163; Sagi M & Fluhr R. (2001) Plant Physiol 126(3):1281-90; Hückelhoven R & Kogel KH (1998) Mol Plant Microbe Interact 11:292-300; so wie in den vorgenannten Artikeln zitierten Referenzen).

10

“Funktionelle Äquivalente” eines NADPH-Oxidase-Proteins meint bevorzugt solche Sequenzen, die von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abgeleitet oder zu dieser homolog sind und

15 die gleichen wesentlichen Eigenschaften aufweisen.

Dabei kann die Effizienz der Pathogenresistenz sowohl nach unten als auch nach oben im Vergleich zu einem Wert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassen eine Polypeptidse-

20 quenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 abweichen. Bevorzugt sind solche funktionelle Äquivalente, bei denen sich die Effizienz der Pathogenresistenz – gemessen beispielsweise an der Penetrationseffizienz eines Pathogens (Haustoriumbildung) – um nicht mehr als 50 %, bevorzugt 25 %,

25 besonders bevorzugt 10 % von einem Vergleichswert erhalten unter Verminderung einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 unterscheidet. Besonders bevorzugt sind solche Sequenzen, bei deren Verminderung die Effizienz der Pathogenresistenz quanti-

30 tativ um mehr als 50 %, bevorzugt 100 %, besonders bevorzugt 500 %, ganz besonders bevorzugt 1000 % einen Vergleichswert erhalten bei Verminderung einer der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 übersteigt.

35

Der Vergleich wird bevorzugt unter analogen Bedingungen durchgeführt. “Analoge Bedingungen” bedeutet, dass alle Rahmenbedingungen wie beispielsweise Kultur- oder Zuchtbefindungen, Assaybedingungen (wie Puffer, Temperatur, Substrate, Pathogen-

40 konzentration etc.) zwischen den zu vergleichenden Versuchen identisch gehalten werden und die Ansätze sich allein durch die Sequenz der zu vergleichenden NADPH-Oxidasen, ihrem Ursprungsorganismus und gegebenenfalls dem Pathogen unterscheiden. Bei Wahl des Pathogens ist für den Vergleich jeweils das Pathogen

45 zu wählen, das dem jeweils anderen – unter Berücksichtigung der Artspezifität – am nächsten kommt.

"Funktionelle Äquivalente" meint insbesondere natürliche oder künstliche Mutationen der NADPH-Oxidasen umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 sowie homologe Polypeptide aus anderen Pflanzen.

5 welche weiterhin im wesentlichen gleiche Eigenschaften aufweisen. Bevorzugt sind homologe Polypeptide aus oben beschriebenen bevorzugten Pflanzen. Die zu den im Rahmen dieser Erfindung offensichtlichen NADPH-Oxidase Sequenzen homologen Sequenzen aus anderen Pflanzen (beispielsweise *Arabidopsis thaliana*) können z.B. durch

10 Datenbanksuche oder Durchmustern von Gen-Banken – unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Sequenzen als Suchsequenz vzw. Sonderleicht aufgefunden werden. Entsprechende Sequenzen sind oben mit GenBank Acc-No. beispielhaft aufgeführt.

15 Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Aminosäurereste. Somit werden beispielsweise auch solche Polypeptide durch die vorliegende Erfindung mit umfasst, welche man durch Modifikation eines Polypeptides umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß

20 SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 erhält.

Unter Homologie zwischen zwei Nukleinsäuresequenzen wird die Identität der Nukleinsäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des

25 Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin, Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA; Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389ff) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

30	Gap Weight: 50	Length Weight: 3
	Average Match: 10	Average Mismatch: 0

Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie

35 von mindestens 80 % auf Nukleinsäurebasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

40 Unter Homologie zwischen zwei Polypeptiden wird die Identität der Aminosäuresequenz über die jeweils gesamte Sequenzlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Programmalgorithmus GAP (Wisconsin Package Version 10.0, University of Wisconsin,

45 Genetics Computer Group (GCG), Madison, USA) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight: 8

Length Weight: 2

Average Match: 2,912

Average Mismatch: -2,003

5 Beispielhaft wird unter einer Sequenz, die eine Homologie von mindestens 80 % auf Proteinbasis mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, eine Sequenz verstanden, die bei einem Vergleich mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Homologie von mindestens 80 % aufweist.

10

Funktionelle Äquivalente, abgeleitet von einer NADPH-Oxidase umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 durch Substitution, Insertion oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt

15 mindestens 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem Polypeptid umfassend eine Polypeptidsequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 und zeichnen sich durch die gleichen wesentlichen Eigenschaften

20 wie diese aus.

Funktionelle Äquivalente, abgeleitet einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 umfassenden NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz durch Substitution, Insertion

25 oder Deletion, haben eine Homologie von mindestens 50 %, bevorzugt 70 %, vorzugsweise mindestens 90 %, besonders bevorzugt mindestens 95 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 98 % zu einem der erfindungsgemäßen Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 und kodieren für Polypeptide mit den 30 gleichen wesentlichen Eigenschaften wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

Auch die Durchmusterung von cDNA- oder genomischen-Bibliotheken 35 anderer Organismen, bevorzugt von den weiter unten genannten als Wirt zur Transformation geeigneten Pflanzenarten, unter Verwendung der unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebene Nukleinsäuresequenzen oder Teilen derselben als Sonde, ist ein dem Fachmann geläufiges Verfahren, um Homologe 40 in anderen Arten zu identifizieren. Dabei haben die von den Nukleinsäuresequenzen gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 abgeleiteten Sonden eine Länge von mindestens 20 bp, bevorzugt mindestens 50 bp, besonders bevorzugt mindestens 100 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 bp, am meisten 45 bevorzugt mindestens 400 bp. Für die Durchmusterung der Bibliotheken kann auch ein zu den unter SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11,

13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen Sequenzen komplementärer DNA-Strang eingesetzt werden.

Funktionelle Äquivalente umfasst DNA Sequenzen, die unter 5 Standardbedingungen mit der durch SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 beschriebenen NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenzen, der zu ihr komplementären Nukleinsäuresequenz oder teilen der vorgenannten hybridisieren und als vollständige Sequenzen für Proteine kodieren, die die gleichen wesentlichen 10 Eigenschaften haben wie ein Polypeptide umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22.

"Standardhybridisierungsbedingungen" ist breit zu verstehen und meint stringente als auch weniger stringente Hybridisierungs- 15 bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind unter anderem bei Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T et al., in Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57) oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 20 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Beispielhaft können die Bedingungen während des Waschschrittes ausgewählt sein aus dem Bereich von Bedingungen begrenzt von solchen mit geringer Stringenz (mit ungefähr 2X SSC bei 50°C) und 25 solchen mit hoher Stringenz (mit ungefähr 0.2X SSC bei 50°C bevorzugt bei 65°C) (20X SSC: 0,3M Natriumcitrat, 3M NaCl, pH 7.0). Darüberhinaus kann die Temperatur während des Waschschrittes von niedrig stringenten Bedingungen bei Raumtemperatur, ungefähr 22°C, bis zu stärker stringenten Bedingungen bei ungefähr 65°C angehoben 30 werden. Beide Parameter, Salzkonzentration und Temperatur, können gleichzeitig variiert werden, auch kann einer der beiden Parameter konstant gehalten und nur der andere variiert werden. Während der Hybridisierung können auch denaturierende Agenzien wie zum Beispiel Formamid oder SDS eingesetzt werden. In Gegen- 35 wart von 50% Formamid wird die Hybridisierung bevorzugt bei 42°C ausgeführt. Einige beispielhafte Bedingungen für Hybridisierung und Waschschritt sind infolge gegeben:

(1) Hybridisierungbedingungen zum Beispiel aus nachfolgenden 40 Bedingungen ausgewählt sein:

- a) 4X SSC bei 65°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)
- b) 6X SSC bei 45°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA),
- c) 6X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)

31

d) 4XSSC, 50 % Formamid bei 42°C (mit - optional - 100 µg/ml denaturierter, fragmentierte Fischsperma-DNA)
e) 2X oder 4X SSC bei 50°C (schwach stringente Bedingung),
f) 30 bis 40 % Formamid, 2X oder 4X SSC bei 42°C (schwach
5 stringente Bedingung).

(2) Waschschritte können zum Beispiel aus nachfolgenden Bedingungen ausgewählt sein:

10 a) 0,015 M NaCl/0,0015 M Natriumcitrat/0,1 % SDS bei 50°C.
b) 0,1X SSC bei 65°C.
c) 0,1X SSC, 0,5 % SDS bei 68°C.
d) 0,1X SSC, 0,5 % SDS, 50 % Formamid bei 42°C.
e) 0,2X SSC, 0,1 % SDS bei 42°C.
15 f) 2X SSC bei 65°C (schwach stringente Bedingung).

Die Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder der NADPH-Oxidase-Funktion kann auf vielfältige Art und Weise realisiert werden.

20 "Verminderung" oder "vermindern" ist im Zusammenhang mit einer NADPH-Oxidase, einer NADPH-Oxidase Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion weit auszulegen und umfasst die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen. Eine Ver-
minderung im Sinne der Erfindung umfasst auch eine mengenmäßige Verringerung einer NADPH-Oxidase bis hin zu einem im wesentlichen
25 vollständigen Fehlen der NADPH-Oxidase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des NADPH-Oxidase-Proteins). Dabei können einer oder mehrere essentielle Einheiten der NADPH-Oxidase vermindert werden. Dabei wird die Expression
30 eines bestimmter NADPH-Oxidase oder die NADPH-Oxidase-Aktivität bzw. NADPH-Oxidase-Funktion in einer Zelle oder einem Organismus bevorzugt um mehr als 50 %, besonders bevorzugt um mehr als 80 %, ganz besonders bevorzugt um mehr als 90% vermindert.
35
40 Erfindungsgemäß sind verschiedene Strategien zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins, der NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-Oxidase-Funktion umfasst. Beispielsweise - jedoch nicht einschränkend - seien zu nennen:

- a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nukleinsäuresequenz (NAox-dsRNA) oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten;
- 5 b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette. Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die antisense-Nukleinsäuresequenz gegen ein NADPH-Oxidase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen) oder ein NADPH-Oxidase-Gen-
10 transkript (also RNA-Sequenzen) gerichtet ist. Umfasst sind auch
α-anomere Nukleinsäuresequenzen.
- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
15
- d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
20
- e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase -Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
25
- f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette
- 30 g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.
- 35 h) Einführen von Mutationen in endogenen NADPH-Oxidase Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der NADPH-Oxidase-Expression, NADPH-Oxidase-Aktivität oder NADPH-
40 Oxidase-Funktion im Sinne der Erfindung bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des NADPH-Oxidase-Proteins, des Transports des NADPH-Oxidase-Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomen-
45 anlagerung, Hemmung des RNA-Spleißens, Induktion eines NADPH-

Oxidase-RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translations-elongation oder -termination umfassen.

Die einzelnen bevorzugten Verfahren seien infolge kurz
5 beschrieben:

a) Einbringung einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Nuklein-säuresequenz (NAox-dsRNA)

10 Das Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA ("double-stranded RNA interference"; dsRNAi) ist vielfach in tierischen und pflanzlichen Organismen beschrieben (z.B. Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401-415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806-811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; 15 WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035; WO 00/63364). Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird ausdrücklich Bezug genommen. Eine effiziente Gensuppression kann auch bei transienter Expression oder nach transienter Transformation beispielsweise infolge einer biolistischen Trans-formation gezeigt werden (Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24:895-903). dsRNAi-Verfahren beruhen auf dem Phänomen, dass durch gleichzeitiges Einbringen von komplementären Strang- und Gegenstrang eines Gentranskriptes eine hocheffiziente Unterdrückung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt wird. 20 25 Der bewirkte Phänotyp kommt dem einer entsprechenden knock-out Mutanten sehr ähnlich (Waterhouse PM et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95:13959-64).

Das dsRNAi-Verfahren hat sich bei der Verminderung der NADPH-30 Oxidase-Expression als besonders effizient und vorteilhaft erwiesen. Wie u.a. in WO 99/32619 beschrieben sind dsRNAi-Ansätze klassischen antisense-Ansätzen deutlich überlegen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich daher 35 auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einführung in eine Pflanze (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Samen) die Verminderung eines NADPH-Oxidase bewirken.

40 Das doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins ist dadurch gekennzeichnet, dass

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu 45 zumindest einem Teil einer NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

5 In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform umfasst das doppelsträngige RNA-Molekül zur Verminderung der Expression eines NADPH-Oxidase Proteins

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribo-
10 nukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein, und

15 b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen - bevorzugt vollständig - komplementären ist.

In Bezug auf die doppelsträngigen RNA-Moleküle meint NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenz bevorzugt eine Sequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21.

Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch 25 Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der NADPH-Oxidase Zielsequenz oder einer funktionell äquivalenten Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirken. Bevorzugt beträgt die Homologie nach obiger Definition mindestens 75 %, bevorzugt mindestens 80 %, ganz besonders bevorzugt mindestens 90 % am meisten bevorzugt 100 % zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben (bzw. zwischen 30 dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang einer Nuklein- 35 säuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben).

Die Länge des Teilabschnittes beträgt mindestens 10 Basen, 40 bevorzugt mindestens 25 Basen, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen.

Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als 45 Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines Speicherprotein Gentranskriptes zu hybridisieren (z.B.

in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

"Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-
5 RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punkt-
mutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-
Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie min-
destens 80 %, bevorzugt mindestens 90 %, ganz besonders bevorzugt
mindestens 95 %, am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "anti-
10 sense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Strangs.

"Teil des "sense"-RNA-Transkriptes" einer Nukleinsäuresequenz
kodierend für ein NADPH-Oxidase Protein oder ein funktionelles
Äquivalent desselben meint Fragmente einer RNA oder mRNA
15 transkribiert von einer für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein
funktionelles Äquivalent desselben kodierenden Nukleinsäure-
sequenz, bevorzugt von einem NADPH-Oxidase-Gen. Dabei haben die
Fragmente bevorzugt eine Sequenzlänge von mindestens 20 Basen,
bevorzugt mindestens 50 Basen, besonders bevorzugt mindestens
20 100 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 200 Basen, am
meisten bevorzugt mindestens 500 Basen. Umfasst ist auch die
vollständige transkribierte RNA oder mRNA.

Umfasst ist auch die Verwendung der erfindungsgemäßen dsRNA-
25 Moleküle in den erfindungsgemäßen Verfahren zur Erzeugung einer
Pathogenresistenz in Pflanzen.

Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen polymerisierter Ribo-
nukleotide bestehen. Es können ferner Modifikationen sowohl des
30 Zucker-Phosphat-Gerüsts als auch der Nukleoside vorliegen. Bei-
spielsweise können die Phosphodiesterbindungen der natürlichen
RNA dahingehend modifiziert sein, dass sie zumindest ein Stick-
stoff oder Schwefel-Heteroatom umfassen. Basen können dahin-
gehend modifiziert werden, dass die Aktivität beispielsweise von
35 Adenosindeaminase eingeschränkt wird. Solche und weitere Modi-
fikationen sind weiter unten bei den Verfahren zur Stabilisierung
von antisense-RNA beschrieben.

Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch
40 mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben
definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle
oder den Organismus eingebracht werden.

Die dsRNA kann enzymatisch oder ganz oder teilweise chemisch-
45 synthetisch hergestellt werden.

Die doppelsträngige dsRNA Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder - bevorzugt - ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden.

5

Bei einem einzelnen, selbstkomplementären Strang, können "sense"- und "antisense"-Sequenz durch eine verbindende Sequenz ("Linker") verknüpft sein und beispielsweise eine Haarnadelstruktur ausbilden. Bevorzugt kann die verbindende Sequenz ein Intron sein,

10 das nach Synthese der dsRNA herausgespleißt wird.

Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

15

Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies auf verschiedene Art geschehen:

20 a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,

b) Kotransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit

25 dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

c) Kreuzung von zwei Pflanzen, die mit jeweils einem Vektor transformiert wurden, wobei der eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

30 Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden. Wie in WO 99/53050 kann

35 die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch einen "Linker" (beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression eines Konstruktes erfordern und die komplementären Stränge stets in

40 einem äquimolaren Verhältnis umfassen.

Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- oder "sense"-Strang einer dsRNA oder für den selbstkomplementären Strang der dsRNA, werden bevorzugt in einen Vektor insertiert

45 und mit den unten beschriebenen Verfahren stabil (beispielsweise unter Verwendung von Selektionsmarkern) in das Genom

einer Pflanze insertiert, um eine dauerhafte Expression der dsRNA zu gewährleisten.

Die dsRNA kann unter Verwendung einer Menge eingeführt werden,
5 die zumindest ein Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

Wie bereits beschrieben, ist eine 100%ige Sequenzidentität
10 zwischen dsRNA und einem NADPH-Oxidase Gentranskript oder dem Gentranskript eines funktionell äquivalenten Gens nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der NADPH-Oxidase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie
15 infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der NADPH-Oxidase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die NADPH-Oxidase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Die hohe Sequenz-
20 homologie zwischen den NADPH-Oxidase Sequenzen aus Reis, Mais und Gerste lässt auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Proteins innerhalb von Pflanzen schließen, so dass die Expression einer dsRNA abgeleitet von einer der NADPH-Oxidase Sequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19
25 oder 21 auch einen vorteilhaften Effekt in anderen Pflanzenarten haben dürfte.

Auch ist es aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen NADPH-Oxidase-Proteinen und ihren funktionellen Äquivalenten mög-
30 lich mit einer einzigen dsRNA, die ausgehend von einer bestimmten NADPH-Oxidase-Sequenz eines Organismus generiert wurde, die Expression weiterer homologer NADPH-Oxidase-Proteine und/oder deren funktioneller Äquivalente des gleichen Organismus oder aber auch die Expression von NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen ver-
35 wandten Arten zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereich von NADPH-Oxidase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

40 Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise Promotor, Enhancer, Silencer, Splice-Donor oder -Akzeptor, Poly-
45 adenylierungssignal) gebracht werden. Entsprechend vorteilhafte Konstruktionen sind weiter unten beschrieben. Eine Poly-

adenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein.

Eine dsRNA kann chemisch oder enzymatisch synthetisiert werden.

5 Dazu können zelluläre RNA Polymerasen oder Bakteriophagen RNA Polymerasen (wie z.B. T3-, T7- oder SP6 RNA-Polymerase) verwendet werden. Entsprechende Verfahren zu in vitro Expression von RNA sind beschrieben (WO 97/32016; US 5,593,874; US 5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214, US 5,804,693). Eine chemisch oder
10 enzymatisch in vitro synthetisierte dsRNA kann vor der Einführung in eine Zelle, Gewebe oder Organismus aus dem Reaktionsgemisch beispielsweise durch Extraktion, Präzipitation, Elektrophorese, Chromatographie oder Kombinationen dieser Verfahren ganz oder teilweise aufgereinigt werden. Die dsRNA kann unmittelbar in die
15 Zelle eingeführt werden oder aber auch extrazellulär (z.B. in den interstitialen Raum) appliziert werden.

Bevorzugt wird die Pflanze jedoch stabil mit einem Expressionskonstrukt, das die Expression der dsRNA realisiert, transformiert. Entsprechende Verfahren sind weiter unten beschrieben.
20

b) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz

Verfahren zur Suppression eines bestimmten Proteins durch Verhinderung der Akkumulation seiner mRNA durch die "antisense"-Technologie sind vielfach - auch in Pflanzen - beschrieben (Sheehy et al. (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85: 8805-8809; US 4,801,340; Mol JN et al. (1990) FEBS Lett 268(2):427-430). Das antisense Nukleinsäuremolekül hybridisiert bzw. bindet mit
25 der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende NADPH-Oxidase-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomicischer DNA - durch
30 der zellulären mRNA und/oder genomischen DNA kodierend für das zu supprimierende NADPH-Oxidase-Zielprotein. Dadurch wird die Transkription und/oder Translation des Zielproteins unterdrückt. Die Hybridisierung kann auf konventionelle Art über die Bildung einer stabilen Duplex oder - im Fall von genomicischer DNA - durch
35 Bindung des antisense Nukleinsäuremoleküls mit der Duplex der genomicischen DNA durch spezifische Wechselwirkung in der großen Furche der DNA-Helix entstehen.

Eine antisense Nukleinsäuresequenz geeignet zur Verminderung
40 eines NADPH-Oxidase-Proteins kann unter Verwendung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21, nach den Basenpaarregeln von Watson und Crick abgeleitet werden.
45 Die antisense Nukleinsäuresequenz kann zu der gesamten transkribierten mRNA des besagten Proteins komplementär sein, sich auf die kodierende Region beschränken oder nur aus einem

Oligonukleotid bestehen, das zu einem Teil der kodierenden oder nicht-kodierenden Sequenz der mRNA komplementär ist. So kann das Oligonukleotid beispielsweise komplementär zu der Region sein, die den Translationsstart für das besagte Protein umfasst. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können eine Länge von zum Beispiel 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide haben, können aber auch länger sein und mindestens 100, 200, 500, 1000, 2000 oder 5000 Nukleotide umfassen. Antisense-Nukleinsäuresequenzen können rekombinant exprimiert oder chemisch bzw. enzymatisch unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren synthetisiert werden. Bei der chemischen Synthese können natürlich oder modifizierte Nukleotide verwendet werden. Modifizierte Nukleotide können der antisense Nukleinsäuresequenz eine erhöhte biochemische Stabilität verleihen und zu einer erhöhten physikalischen Stabilität der Duplex gebildet aus antisense-Nukleinsäuresequenz und sense-Zielsequenz führen. Verwendet werden können beispielsweise Phosphorothioatderivative und Acridin-substituierte Nukleotide wie 5-Fluorouracil, 5-Bromouracil, 5-Chlorouracil, 5-Iodouracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydouracil, β -D-Galactosylqueosin, Inosine, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, β -D-mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentenyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure, Pseudouracil, Queosine, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure, 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil und 2,6-Diaminopurin.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Expression eines NADPH-Oxidase-Proteins durch Nukleotidsequenzen inhibiert werden, die komplementär zu der regulatorischen Region eines NADPH-Oxidase-Gens (z.B. einem NADPH-Oxidase Promoter und/oder Enhancer) sind und triple-helikale Strukturen mit der dortigen DNA-Doppelhelix ausbilden, so dass die Transkription des NADPH-Oxidase-Gens vermindert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (Helene C (1991) Anticancer Drug Res 6(6):569-84; Helene C et al. (1992) Ann NY Acad Sci 660:27-36; Maher LJ (1992) Bioassays 14(12):807-815).

45 In einer weiteren Ausführungsform kann das antisense Nukleinsäuremolekül eine α -anomere Nukleinsäure sein. Derartige α -anomere Nukleinsäuremoleküle bilden spezifische doppel-

strängige Hybride mit komplementärer RNA in denen - im Unterschied zu den konventionellen β -Nukleinsäuren - die beiden Stränge parallel zueinander verlaufen (Gautier C et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6625-6641). Das antisense Nukleinsäuremolekül kann ferner auch 2'-O-Methylribonukleotide (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res 15:6131-6148) oder chimäre RNA-DNA Analoge beinhalten (Inoue et al. (1987) FEBS Lett 215:327-330).

c) Einbringung einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz
10 kombiniert mit einem Ribozym

Vorteilhaft kann die oben beschriebene antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Katalytische RNA-Moleküle oder Ribozyme können an jede beliebige Ziel-RNA angepasst werden und spalten das Phosphodiester-Gerüst an spezifischen Positionen, wodurch die Ziel-RNA funktionell deaktiviert wird (Tanner NK (1999) FEMS Microbiol Rev 23(3):257-275). Das Ribozym wird dadurch nicht selber modifiziert, sondern ist in der Lage, weitere Ziel-RNA-Moleküle analog zu spalten, wodurch es die Eigenschaften eines Enzyms erhält. Der Einbau von Ribozym-sequenzen in "antisense"-RNAs verleiht eben diesen "antisense"-RNAs diese enzymähnliche, RNA-spaltende Eigenschaft und steigert so deren Effizienz bei der Inaktivierung der Ziel-RNA. Die Herstellung und Verwendung entsprechender Ribozym-"antisense"-RNA-Moleküle ist beispielsweise beschrieben bei Haseloff et al. (1988) Nature 334:585-591.

Auf diese Art können Ribozyme (z.B. "Hammerhead"-Ribozyme; Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591) verwendet werden, um die mRNA eines zu supprimierenden Enzyms - z.B. NADPH-Oxidase - katalytisch zu spalten und die Translation zu verhindern. Die Ribozym-Technologie kann die Effizienz einer antisense-Strategie erhöhen. Verfahren zur Expression von Ribozymen zur Verminderung bestimmter Proteine sind beschrieben in (EP 0 291 533, EP 0 321 35201, EP 0 360 257). In pflanzlichen Zellen ist eine Ribozym-Expression ebenfalls beschrieben (Steinecke P et al. (1992) EMBO J 11(4):1525-1530; de Feyter R et al. (1996) Mol Gen Genet. 250(3):329-338). Geeignete Zielsequenzen und Ribozyme können zum Beispiel wie bei "Steinecke P, Ribozymes, Methods in Cell Biology 50, Galbraith et al. eds, Academic Press, Inc. (1995), S. 449-460" beschrieben, durch Sekundärstrukturberechnungen von Ribozym- und Ziel-RNA sowie durch deren Interaktion bestimmt werden (Bayley CC et al. (1992) Plant Mol Biol. 18(2):353-361; Lloyd AM and Davis RW et al. (1994) Mol Gen Genet. 242(6):653-657). Beispielsweise können Derivate der Tetrahymena L-19 IVS RNA konstruiert werden, die komplementäre Bereiche zu der mRNA des zu supprimierenden NADPH-Oxidase Proteins aufweisen

(siehe auch US 4,987,071 und US 5,116,742). Alternativ können solche Ribozyme auch über einen Selektionsprozess aus einer Bibliothek diverser Ribozyme identifiziert werden (Bartel D und Szostak JW (1993) Science 261:1411-1418).

5

d) Einbringung einer NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenz zur Induktion eines Kosuppression

Die Expression einer NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz in sense-
10 Orientierung kann zu einer Kosuppression des entsprechenden homologen, endogenen Gens führen. Die Expression von sense-RNA mit Homologie zu einem endogenen Gen kann die Expression desselben vermindern oder ausschalten, ähnlich wie es für antisense Ansätze beschrieben wurde (Jorgensen et al. (1996) Plant Mol
15 Biol 31(5):957-973; Goring et al. (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:1770-1774; Smith et al. (1990) Mol Gen Genet 224:447-481; Napoli et al. (1990) Plant Cell 2:279-289; Van der Krol et al. (1990) Plant Cell 2:291-99). Dabei kann das eingeführte Konstrukt das zu vermindernde, homologe Gen ganz oder nur teilweise
20 representieren. Die Möglichkeit zur Translation ist nicht erforderlich. Die Anwendung dieser Technologie auf Pflanzen ist beispielsweise beschrieben bei Napoli et al. (1990) The Plant Cell 2: 279-289 und in US 5,034,323.

25 Bevorzugt wird die Kosuppression unter Verwendung einer Sequenz realisiert, die im wesentlichen identisch ist zu zumindest einem Teil der Nukleinsäuresequenz kodierend für ein NADPH-Oxidase-Protein oder ein funktionelles Äquivalent desselben, beispielsweise der Nukleinsäuresequenz umfassend eine Sequenz gemäß
30 SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 .

e) Einbringung DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase Gene, -RNAs oder Proteine
35 Eine Verminderung einer NADPH-Oxidase Genexpression ist auch mit spezifischen DNA-bindenden Faktoren z.B. mit Faktoren vom Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren möglich. Diese Faktoren lagern sich an die genomische Sequenz des endogenen Zielgens, bevorzugt in den regulatorischen Bereichen, an und bewirken
40 eine Repression des endogenen Gens. Die Verwendung eines solchen Verfahrens ermöglicht die Verminderung der Expression eines endogenen NADPH-Oxidase Gens, ohne dass dessen Sequenz gentechnisch manipuliert werden muss. Entsprechende Verfahren zur Herstellung entsprechender Faktoren sind beschrieben (Dreier B et al. (2001) J Biol Chem 276(31):29466-78; Dreier B et al. (2000) J Mol Biol 303(4):489-502; Beerli RR et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97 (4):1495-1500; Beerli RR et al. (2000) J Biol Chem

275(42):32617-32627; Segal DJ and Barbas CF 3rd. (2000) Curr Opin Chem Biol 4(1):34-39; Kang JS and Kim JS (2000) J Biol Chem 275(12):8742-8748; Beerli RR et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(25):14628-14633; Kim JS et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(8):3616-3620; Klug A (1999) J Mol Biol 293(2):215-218; Tsai SY et al. (1998) Adv Drug Deliv Rev 30(1-3):23-31; Mapp AK et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97(8):3930-3935; Sharrocks AD et al. (1997) Int J Biochem Cell Biol 29(12):1371-1387; Zhang L et al. (2000) J Biol Chem 275(43):33850-33860).

10

Die Selektion dieser Faktoren kann unter Verwendung eines beliebigen Stückes eines NADPH-Oxidase-Gens erfolgen. Bevorzugt liegt dieser Abschnitt im Bereich der Promotorregion. Für eine Genunterdrückung kann er aber auch im Bereich der kodierenden Exons oder Introns liegen. Die entsprechenden Abschnitte sind für den Fachmann mittels Datenbankabfrage aus der Genbank oder – ausgehend von einer NADPH-Oxidase cDNA, deren Gen nicht in der Genbank vorhanden ist, durch Durchmusterung einer genomischen Bibliothek nach korrespondierenden genomischen Klonen erhältlich.

15 20 Die dazu erforderlichen Verfahren sind dem Fachmann geläufig.

Ferner können Faktoren in eine Zelle eingebracht werden, die das NADPH-Oxidase Zielprotein selber inhibieren. Die proteinbindenden Faktoren können z.B. Aptamere (Famulok M und Mayer G (1999) Curr Top Microbiol Immunol 243:123-36) oder Antikörper bzw. Antikörperfragmente oder einzelkettige Antikörper sein. Die Gewinnung dieser Faktoren ist beschrieben und dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wurde ein cytoplasmatischer scFv Antikörper eingesetzt, um die Aktivität des Phytochrom A Proteins in genetisch veränderten Tabakpflanzen zu modulieren (Owen M et al. (1992) Biotechnology (N Y) 10(7):790-794; Franken E et al. (1997) Curr Opin Biotechnol 8(4):411-416; Whitelam (1996) Trend Plant Sci 1:286-272).

35 40 45 50 Die Genexpression kann auch durch maßgeschneiderte, niedermolekulare synthetische Verbindungen unterdrückt werden, beispielsweise vom Polyamid-Typ (Dervan PB und Bürli RW (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:688-693; Gottesfeld JM et al. (2000) Gene Expr 9(1-2):77-91). Diese Oligomere bestehen aus den Bausteinen 3-(Dimethylamino)propylamin, N-Methyl-3-hydroxypyrrrol, N-Methylimidazol und N-Methylpyrrole und können an jedes Stück doppelsträngiger DNA so angepasst werden, dass sie sequenzspezifisch in die große Furche binden und die Expression der dortigen Gensequenzen blockieren. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (siehe unter anderem Bremer RE et al. (2001) Bioorg Med Chem. 9(8):2093-103; Ansari AZ et al. (2001) Chem Biol. 8(6):583-92; Gottesfeld JM et al. (2001) J Mol

Biol. 309(3):615-29; Wurtz NR et al. (2001) Org Lett 3(8):1201-3; Wang CC et al. (2001) Bioorg Med Chem 9(3):653-7; Urbach AR und Dervan PB (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98(8):4343-8; Chiang SY et al. (2000) J Biol Chem. 275(32):24246-54).

5

f) Einbringung von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten

Die NADPH-Oxidase Expression kann effektiv auch durch Induktion des spezifischen NADPH-Oxidase RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al. (1999) Plant J. 20(3):357-362) realisiert werden. Diese Systeme - auch als "VIGS" (viral induced gene silencing) bezeichnet - bringen Nukleinsäuresequenzen mit Homologie zu den zu supprimierenden Transkripten mittels viraler Vektoren in die Pflanze ein. Die Transkription wird sodann - vermutlich mediert durch pflanzliche Abwehrmechanismen gegen Viren - abgeschaltet. Entsprechende Techniken und Verfahren sind beschrieben (Ratcliff F et al. (2001) Plant J 25(2):237-45; Fagard M und Vaucheret H (2000) Plant Mol Biol 43(2-3):285-93; Anandalakshmi R et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(22):13079-84; Ruiz MT (1998) Plant Cell 10(6): 937-46).

g) Einbringung von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen beispielsweise zur Erzeugung von Knockout-Mutanten.

Zur Herstellung eines homolog rekombinanten Organismus mit verminderter NADPH-Oxidase-Aktivität verwendet man beispielsweise ein Nukleinsäurekonstrukt, das zumindest einen Teil eines endogenen NADPH-Oxidase Gens enthält, das durch eine Deletion, Addition oder Substitution mindestens eines Nukleotids so verändert wird, so dass die Funktionalität vermindert oder gänzlich aufgehoben wird. Die Veränderung kann auch die regulativen Elemente (z.B. den Promotor) des Gens betreffen, so dass die kodierende Sequenz unverändert bleibt, eine Expression (Transkription und/oder Translation) jedoch unterbleibt und verhindert wird.

Bei der konventionellen homologen Rekombination ist die veränderte Region an ihrem 5'- und 3'-Ende von weiteren Nukleinsäuresequenzen flankiert, die eine ausreichende Länge für die Ermöglichung der Rekombination aufweisen müssen. Die Länge liegt in der Regel in einem Bereich von mehreren einhundert Basen bis zu mehreren Kilobasen (Thomas KR und Capecchi MR (1987) Cell 51:503; Strepp et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA 95(8):4368-4373). Für die homologe Rekombination wird der Wirts-

organismus - zum Beispiel eine Pflanze - mit dem Rekombinationskonstrukt unter Verwendung der unten beschriebenen Verfahren transformiert und erfolgreich rekombinierte Klone unter Verwendung zum Beispiel einer Antibiotika- oder Herbizidresistenz selektioniert.

Homologe Rekombination ist ein relativ seltenes Ereignis in höheren Eukaryoten, vor allem in Pflanzen. Zufällige Integrationen in das Wirtsgenom überwiegen. Eine Möglichkeit die zufällig integrierten Sequenzen zu entfernen und so Zellklone mit einer korrekten homologen Rekombination anzureichern, besteht in der Verwendung eines sequenzspezifischen Rekombinationssystems wie in US 6,110,736 beschrieben, durch welche unspezifisch integrierte Sequenzen wieder deletiert werden können, was die Selektion erfolgreich über homologe Rekombination integrierter Ereignisse erleichtert. Eine Vielzahl von sequenzspezifischen Rekombinationssystemen kann verwendet werden, beispielhaft sind das Cre/lox-System des Bacteriophagen P1, das FLP/FRT System der Hefe, die Gin Rekombinase des Mu Phagen, die Pin Rekombinase aus *E. coli* und das R/RS System des pSR1 Plasmids genannt. Bevorzugt sind das Bacteriophagen P1 Cre/lox und das Hefe FLP/FRT System. Das FLP/FRT und cre/lox Rekombinasesystem wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet (Odell et al. (1990) Mol Gen Genet 223: 369-378)

25

h) Einführung von Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zur Erzeugung eines Funktionsverlustes (z.B. Generierung von Stopp-Kodons, Verschiebungen im Leseraster etc.)

Weitere geeignete Methoden zur Verminderung der NADPH-Oxidase-Aktivität sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in endogene NADPH-Oxidase Gene zum Beispiel mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in die Pflanze (Zhu et al. (2000) Nat Biotechnol 18(5):555-558) sowie die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B. T-DNA-Mutagenese (Koncz et al. (1992) Plant Mol Biol 20(5):963-976), ENU-(N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff) - Mutagenese oder homologer Rekombination (Hohn B und Puchta (1999) H Proc Natl Acad Sci USA 96:8321-8323.). Punktmutationen können auch mittels DNA-RNA Hybriden erzeugt werden, die auch als "chimeroplasty" bekannt sind (Cole-Strauss et al. (1999) Nucl Acids Res 27(5):1323-1330; Kmiec (1999) Gene therapy American Scientist 87(3):240-247).

Die Methoden der dsRNAi, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet. PTGS-Verfahren wie auch die Verminderung der NADPH-Oxidase-Funktion

oder Aktivität mit dominant-negativen NADPH-Oxidase-Varianten sind besonders vorteilhaft, weil die Anforderungen an die Homologie zwischen dem zu supprimierenden endogenem Gen und der transgen exprimierten sense- oder dsRNA-Nukleinsäuresequenz 5 (bzw. zwischen dem endogenen Gen und seiner dominant-negativen Variante) geringer sind als beispielsweise bei einem klassischen antisense-Ansatz. Entsprechende Homologie-Kriterien sind bei der Beschreibung des dsRNAi-Verfahrens genannt und allgemein für PTGS-Verfahren oder dominant-negative Ansätze übertragbar. Aufgrund der hohen Homologie zwischen den NADPH-Oxidase-Proteinen aus Mais, Reis und Gerste kann auf einen hohen Konservierungsgrad dieses Protein bei Pflanzen geschlossen werden. So kann man voraussichtlich unter Verwendung der NADPH-Oxidase-Nukleinsäuresequenzen aus Gerste, Mais oder Reis auch die Expression von homologen NADPH-Oxidase-Proteinen in anderen Arten effektiv supprimieren, ohne dass die Isolierung und Strukturaufklärung der dort vorkommenden NADPH-Oxidase-Homologen zwingend erforderlich wäre. Dies erleichtert erheblich den Arbeitsaufwand. Analog kann man voraussichtlich auch unter Verwendung von dominant-negativen Varianten eines NADPH-Oxidase-Proteins aus Reis, Mais oder Gerste die Funktion/Aktivität seines Homologs in anderen Pflanzenarten effektiv vermindern oder unterdrücken.

Alle Substanzen und Verbindungen die direkt oder indirekt eine 25 Verminderung der Proteinmenge, RNA-Menge, Genaktivität oder Proteinaktivität eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirken, seien infolge unter der Bezeichnung "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen zusammengefasst. Der Begriff "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung schließt explizit die in den oben beschriebenen Verfahren zum Einsatz kommenden Nukleinsäuresequenzen, Peptide, Proteine oder andere Faktoren ein.

"Einbringung" umfasst im Rahmen der Erfindung alle Verfahren, die dazu geeignet eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung, direkt oder 35 indirekt, in eine Pflanze oder eine Zelle, Kompartiment, Gewebe, Organ oder Samen derselben einzuführen oder dort zu generieren. Direkte und indirekte Verfahren sind umfasst. Die Einbringung kann zu einer vorübergehenden (transienten) Präsenz einer "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise einer dsRNA) führen oder aber auch zu einer dauerhaften (stabilen).

Gemäß der unterschiedlichen Natur der oben beschriebenen Ansätze kann die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung ihre Funktion direkt ausüben (zum Beispiel durch Insertion in ein endogenes 45 NADPH-Oxidase Gen). Die Funktion kann aber auch indirekt nach Transkription in eine RNA (zum Beispiel bei antisense Ansätzen) oder nach Transkription und Translation in ein Protein

(z.B. Bindungsfaktoren) ausgeübt werden. Sowohl direkte als auch indirekt wirkende "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindungen sind erfindungsgemäß umfasst.

5 Einführen umfasst beispielsweise Verfahren wie Transfektion, Transduktion oder Transformation.

"Anti-NADPH-Oxidase" Verbindungen umfasst somit beispielsweise auch rekombinante Expressionskonstrukte, die eine Expression

10 (d.h. Transkription und ggf. Translation) beispielsweise einer NADPH-Oxidase-dsRNA oder einer NADPH-Oxidase "antisense"-RNA - bevorzugt in einer Pflanze oder einem Teil, Gewebe, Organ oder Samen derselben - bedingen.

15 In besagten Expressionskonstrukten steht ein Nukleinsäuremolekül, dessen Expression (Transkription und ggf. Translation) eine "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung generiert, bevorzugt in funktioneller Verknüpfung mit mindestens einem genetischen Kontroll- element (beispielsweise einem Promotor), das eine Expression

20 in einem Organismus, bevorzugt in Pflanzen, gewährleistet. Soll das Expressionskonstrukt direkt in die Pflanze eingeführt und die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung (beispielsweise die NADPH-Oxidase dsRNA) dort in plantae erzeugt werden, so sind pflanzenspezifische genetische Kontrollelemente (beispiels-

25 weise Promotoren) bevorzugt. Die "anti-NADPH-Oxidase"-Verbindung kann jedoch auch in anderen Organismen oder in vitro erzeugt und dann in die Pflanze eingebracht werden (wie in Beispiel 6 und 7 beschrieben). In diesem sind all prokaryotischen oder eukaryotischen genetischen Kontrollelemente (beispielsweise

30 Promotoren) bevorzugt, die die Expression in den jeweils für die Herstellung gewählten Organismus erlauben.

Unter einer funktionellen Verknüpfung versteht man zum Beispiel die sequentielle Anordnung eines Promoters mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz (zum Beispiel einer "anti-NAox-Verbindung) und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz, je nach Anordnung der Nukleinsäuresequenzen zu sense 35 oder anti-sense RNA, erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevor- 40 zugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter der als Promoter fungierenden Sequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander

45

verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Die Herstellung einer funktionellen Verknüpfung als auch die Herstellung einer Expressionskassette kann mittels gängiger Rekombinations- und Klonierungstechniken realisiert werden,
10 wie sie beispielsweise in Maniatis T, Fritsch EF und Sambrook J (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Silhavy TJ, Berman ML und Enquist LW (1984) Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (NY), in Ausubel FM et al.
15 (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience und bei Gelvin et al. (1990) In: Plant Molecular Biology Manual beschrieben sind. Zwischen beide Sequenzen können aber auch weitere Sequenzen positioniert werden, die zum Beispiel die Funktion eines Linkers mit bestimmten
20 Restriktionsenzymeschnittstellen oder eines Signalpeptides haben.. Auch kann die Insertion von Sequenzen zur Expression von Fusionsproteinen führen. Bevorzugt kann die Expressionskassette, bestehend aus einer Verknüpfung von Promoter und zu exprimierender Nukleinsäuresequenz, integriert in einem Vektor vorliegen und
25 durch zum Beispiel Transformation in ein pflanzliches Genom insertiert werden.

Unter einer Expressionskassette sind aber auch solche Konstruktionen zu verstehen, bei denen ein Promoter - zum Beispiel
30 durch eine homologe Rekombination - hinter ein endogenes NADPH-Oxidase-Gen platziert wird, und durch Expression einer antisense NADPH-Oxidase-RNA die erfindungsgemäße Verminderung eines NADPH-Oxidase-Proteins bewirkt wird. Analog kann auch eine "anti-NADPH-Oxidase" Verbindung (zum Beispiel eine Nukleinsäuresequenz
35 kodierend für eines NADPH-Oxidase dsRNA oder eine NADPH-Oxidase antisense RNA) derart hinter einen endogenen Promotor platziert werden, dass der gleiche Effekt auftritt. Beide Ansätze führen zu Expressionskassetten im Sinne der Erfindung.
40 Pflanzenspezifische Promotoren meint grundsätzlich jeden Promotor, der die Expression von Genen, insbesondere Fremdgenen, in Pflanzen oder Pflanzenteilen, -zellen, -geweben, -kulturen steuern kann. Dabei kann die Expression beispielsweise konstitutiv, induzierbar oder entwicklungsabhängig sein.

Bevorzugt sind:

a) Konstitutive Promotoren

5 Bevorzugt sind Vektoren, die eine konstitutive Expression in Pflanzen ermöglichen (Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen 10 Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285-294; Odell et al. 15 (1985) Nature 313:810-812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281-288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221- 228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195-2202). Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der "Rubisco small subunit (SSU)"- 20 Promotor (US 4,962,028), der LeguminB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthase aus Agrobacterium, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus Agrobacterium, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et. al. (1995) Plant Mol Biol 29:637-649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen 25 et al. (1992) Plant Mol Biol 18:675-689; Bruce et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9692-9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), sowie weitere Promotoren von 30 Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist. Als konstitutiver Promotor insbesondere bevorzugt ist der Promotor des Nitrilase-1 (nit1) Gens aus *A. thaliana* (GenBank Acc.-No.: Y07648.2, Nukleotide 2456-4340, Hillebrand et al. (1996) Gene 170:197-200).

35

b) Gewebespezifische Promotoren

Bevorzugt sind ferner Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Blüten, Blätter, Stengel, Wurzeln und Samen.

40

Samenspezifische Promotoren umfassen zum Beispiel den Promotor des Phaseolins (US 5,504,200; Bustos MM et al. (1989) Plant Cell 1(9):839-53), des 2S Albumins (Joseffson LG et al. (1987) J Biol Chem 262:12196-12201), des Legumins (Shirsat A et al. (1989)

45 Mol Gen Genet 215(2): 326-331), des USP (unknown seed protein; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225(3):459-67), des Napin (US 5,608,152; Stalberg K et al. (1996) L Planta 199:515-519),

des Saccharosebindeproteins (WO 00/26388), des Legumin B4 (LeB4; Bäumlein H et al. (1991) Mol Gen Genet 225: 121-128; Baeumlein et al. (1992) Plant Journal 2(2):233-9; Fiedler U et al. (1995) Biotechnology (NY) 13(10):1090f), des Oleosin aus Arabidopsis (WO 98/45461) und des Bce4 aus Brassica (WO 91/13980). Weitere geeignete samenspezifische Promotoren sind die der Gene kodierend für das "High Molecular Weight Glutenin" (HMWG), Gliadin, Verzweigungsenzym, ADP Glucose Pyrophosphatase (AGPase) oder die Stärkesynthase. Bevorzugt sind ferner Promotoren, die eine samenspezifische Expression in Monokotyledonen wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis etc. erlauben. Vorteilhaft eingesetzt werden können der Promoter des lpt2- oder lpt1-Gen (WO 95/15389, WO 95/23230) oder die Promotoren beschrieben in WO 99/16890 (Promotoren des Hordein-Gens, des Glutelin-Gens, des Oryzin-Gens, des Prolamin-Gens, des Gliadin-Gens, des Glutelin-Gens, des Zein-Gens, des Kasirin-Gens oder des Secalin-Gens).

Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Patatin Promotor Klasse I (B33) und den Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.

Blattspezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), den SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase) oder den ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) EMBO J 8:2445-2451). Ganz besonders bevorzugt sind Epidermis-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der Promotor des OXLP-Gens ("Oxalat-Oxidase like protein"; Wei et al. (1998) Plant Mol. Biol. 36:101-112).

Blüten spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635) oder den Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593).

Antheren-spezifische Promotoren umfassen beispielsweise den 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor und den γ -Zein Promotor.

c) Chemisch induzierbare Promotoren

Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48:89-108), durch den die Expression des exogenen Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Beispielhaft seien zu nennen der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein

durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J 2:397-404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclo-
5 hexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334).

d) Stress- oder Pathogen-induzierbare Promotoren

Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder
10 abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (bzw. *gst1* Promotor) z.B. aus Kartoffel (WO 96/28561; Ward et al. (1993) Plant Mol Biol 22:361- 366), der hitzeinduzierbare *hsp70*- oder *hsp80*-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierare alpha-Amylase
15 Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814) oder der licht-induzierbare PPDK Promotor. Weitere pathogen-induzierbare Promotoren umfassen den Flachs *Fis1*-Promotor (WO 96/34949), den *Vst1*-Promotor (Schubert et al. (1997) Plant Mol Biol 34:417-426) sowie den EAS4 Sesquiterpene-Cyclase-Promotor aus Tabak (US 6,100,451).

20

Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen ferner die Promotoren von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden, wie beispielsweise Promotoren der Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, β -1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) Neth J Plant Pathol 89:245-254; Uknas, et al. (1992) Plant Cell 4:645-656; Van Loon (1985) Plant Mol Viral 4:111-116; Marineau et al. (1987) Plant Mol Biol 9:335-342; Matton et al. (1987) Molecular Plant-Microbe Interactions 2:325-342; Somssich et al. (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:2427-2430; Somssich et al. (1988) Mol Gen Genetics 2:93-98; Chen et al. (1996) Plant J 10:955-966; Zhang and Sing (1994) Proc Natl Acad Sci USA 91:2507-2511; Warner, et al. (1993) Plant J 3:191-201; Siebertz et al. (1989) Plant Cell 1:961-968(1989).

35 Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des *pinII* Gens (EP-A 0 375 091; Ryan (1990) Ann Rev Phytopath 28:425-449; Duan et al. (1996) Nat Biotech 14:494-498), des *wun1*- und *wun2*-Gens (US 5,428,148), des *win1*- und *win2*-Gens (Stanford et al. (1989) Mol Gen Genet 215:200-208), des Systemin-Gens
40 (McGurl et al. (1992) Science 225:1570-1573), des *WIP1*-Gens (Rohmeier et al. (1993) Plant Mol Biol 22:783-792; Eckelkamp et al. (1993) FEBS Letters 323:73-76), des *MPI*-Gens (Corderok et al. (1994) Plant J 6(2):141-150) und dergleichen.

45 Eine Quelle für weitere pathogen-induzierbare Promotoren stellt die PR-Genfamilie dar. Eine Reihe von Elementen in diesen Promotoren haben sich als vorteilhaft erwiesen. So vermittelt die

Region -364 bis -288 im Promotor von PR-2d Salicylat-Spezifität (Buchel et al. (1996) Plant Mol Biol 30, 493-504). Die Sequenz 5'-TCATCTTCTT-3' taucht im Promotor der Gersten β -1,3-Glucanase und in mehr als 30 weiteren stress-induzierten Genen wiederholt 5 auf. Diese Region bindet in Tabak ein nukleäres Protein, dessen Abundanz durch Salicylat erhöht wird. Die PR-1-Promotoren aus Tabak und Arabidopsis (EP-A 0 332 104, WO 98/03536) eignen sich ebenfalls als pathogen-induzierbare Promotoren. Bevorzugt, da besonders spezifisch durch Pathogen-induziert, sind die "acidic 10 PR-5"--(aPR5)-Promotoren aus Gerste (Schweizer et al. (1997) Plant Physiol 114:79-88) und Weizen (Rebmann et al. (1991) Plant Mol Biol 16:329-331). aPR5-Proteine akkumulieren in ca. 4 bis 6 Stunden nach Pathogenbefall und zeigen nur eine sehr geringe Hintergrundsexpression (WO 99/66057). Ein Ansatz, um eine erhöhte 15 pathogen-induzierte Spezifität zu erreichen, bildet die Herstellung synthetischer Promotoren aus Kombinationen von bekannten pathogen-responsiven Elementen (Rushton et al. (2002) Plant Cell 14, 749-762; WO 00/01830; WO 99/66057). Weitere pathogen-induzierbare Promotoren aus verschiedenen Arten sind dem 20 Fachmann bekannt (EP-A 1 165 794; EP-A 1 062 356; EP-A 1 041 148; EP-A 1 032 684;

e) Entwicklungsabhängige Promotoren

25 Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise fruchtreifungs-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifungs-spezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die gewebe-spezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe 30 naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.

Besonders bevorzugt sind konstitutive, sowie Blatt und/oder Stengel-spezifische, pathogen-induzierbare und epidermis-spezifische Promotoren, wobei pathogen-induzierbar und epidermis-35 spezifische Promotoren am meisten bevorzugt sind.

Es können ferner weitere Promotoren funktionell mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz verknüpft sein, die eine Expression in weiteren Pflanzengeweben oder in anderen 40 Organismen, wie zum Beispiel *E.coli* Bakterien ermöglichen. Als Pflanzen Promotoren kommen im Prinzip alle oben beschriebenen Promotoren in Frage.

Die in den erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren 45 enthaltenen Nukleinsäuresequenzen können mit weiteren genetischen Kontrollsequenzen neben einem Promoter funktionell verknüpft sein. Der Begriff der genetischen Kontrollsequenzen ist breit

zu verstehen und meint all solche Sequenzen, die einen Einfluss auf das Zustandekommen oder die Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassette haben. Genetische Kontrollsequenzen modifizieren zum Beispiel die Transkription und Translation in prokaryotischen oder eukaryotischen Organismen. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäßen Expressionskassetten 5'-strom-aufwärts von der jeweiligen transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz den Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz als zusätzliche genetische Kontrollsequenz, sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils funktionell verknüpft mit der transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen auch weitere Promotoren, Promotorelemente oder Minimalpromotoren, die die expressionsteuernden Eigenschaften modifizieren können. So kann durch genetische Kontrollsequenzen zum Beispiel die gewebespezifische Expression zusätzlich abhängig von bestimmten Stressfaktoren erfolgen. Entsprechende Elemente sind zum Beispiel für Wasserrstress, Abscisinsäure (Lam E und Chua NH, J Biol Chem 1991; 266(26): 17131 -17135) und Hitzestress (Schoffl F et al., Molecular & General Genetics 217(2-3):246-53, 1989) beschrieben.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfindungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Genetische Kontrollsequenzen umfassen ferner auch die 5'-untranslatierte Regionen, Introns oder nichtkodierende 3'-Region von Genen wie beispielsweise das Actin-1 Intron, oder die Adh1-S Introns 1, 2 und 6 (allgemein: The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, New York (1994)). Es ist gezeigt worden, dass diese eine signifikante Funktionen bei der Regulation der Genexpression spielen können. So wurde gezeigt, dass 5'-untranslatierte Sequenzen die transiente Expression heterologer Gene verstärken können. Beispielhaft für Translationsverstärker sei die 5'-Leadersequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus zu nennen (Gallie et al. (1987) Nucl Acids Res 15:8693-8711) und dergleichen. Sie können ferner die Gewebspezifität fördern (Rouster J et al. (1998) Plant J 15:435-440).

Die Expressionskassette kann vorteilhafterweise eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promoter enthalten, die eine erhöhte transgene Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der transgen

zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im 5 Genkonstrukt enthalten sein.

Als Kontrollsequenzen geeignete Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiAChS entsprechen (Gielen et al. (1984) EMBO J 3:835 ff) oder funktionelle Äquivalente davon. Beispiele für besonders geeignete Terminatorsequenzen sind der OCS (Octopin-Synthase)-Terminator und der NOS (Nopalatin-Synthase)-Terminator.

Als Kontrollsequenzen sind weiterhin solche zu verstehen, die eine homologe Rekombination bzw. Insertion in das Genom eines Wirtsorganismus ermöglichen oder die Entfernung aus dem Genom erlauben. Bei der homologen Rekombination kann zum Beispiel der 20 natürliche Promoter eines bestimmten Gens gegen einen Promoter mit Spezifität für die embryonale Epidermis und/oder die Blüte ausgetauscht werden. Methoden wie die cre/lox-Technologie erlauben eine gewebespezifische, unter Umständen induzierbare Entfernung der Expressionskassette aus dem Genom des Wirtsorganismus 25 (Sauer B (1998) Methods. 14(4):381-92). Hier werden bestimmte flankierende Sequenzen dem Zielgen angefügt (lox-Sequenzen), die später eine Entfernung mittels der cre-Rekombinase ermöglichen.

Eine Expressionskassetten und die von ihr abgeleiteten 30 Vektoren können weitere Funktionselemente enthalten. Der Begriff Funktionselement ist breit zu verstehen und meint all solche Elemente, die einen Einfluss auf Herstellung, Vermehrung oder Funktion der erfindungsgemäßen Expressionskassetten, Vektoren oder transgenen Organismen haben. Beispielhaft aber 35 nicht einschränkend seien zu nennen:

- a) Selektionsmarker, die eine Resistenz gegen einen Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat (WO 98/45456), Antibiotika oder Biozide, bevorzugt Herbicide, wie zum 40 Beispiel Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin, oder Phosphinothricin etc. verleihen. Besonders bevorzugte Selektionsmarker sind solche die eine Resistenz gegen Herbicide verleihen. Beispielhaft seien genannt: DNA Sequenzen, die für Phosphinothricinacetyltransferasen (PAT) kodieren und 45 Glutaminsynthaseinhibitoren inaktivieren (bar und pat Gen), 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthasegene (EPSP Synthase-gene), die eine Resistenz gegen Glyphosat® (N-(phosphono-

methyl)glycin) verleihen, das für das Glyphosat® degradierende Enzyme kodierende gox Gen (Glyphosatoxidoreduktase), das deh Gen (kodierend für eine Dehalogenase, die Dalapon inaktiviert), Sulfonylurea- und Imidazolinon inaktivierende 5 Acetolactatsynthasen sowie bxn Gene, die für Bromoxynil degradierende Nitrilaseenzyme kodieren, das aasa-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Apectinomycin verleiht, das Streptomycinphosphotransferase (SPT) Gen, das eine Resistenz gegen Streptomycin gewährt, das Neomycin- 10 phosphotransferas (NPTII) Gen, das eine Resistenz gegen Kanamycin oder Geneticidin verleiht, das Hygromycinphosphotransferase (HPT) Gen, das eine Resistenz gegen Hygromycin vermittelt, das Acetolactatsynthas Gen (ALS), das eine Resistenz gegen Sulfonylharnstoff-Herbizide verleiht 15 (z.B. mutierte ALS-Varianten mit z.B. der S4 und/oder Hra Mutation).

b) Reportergene, die für leicht quantifizierbare Proteine kodieren und über Eigenfarbe oder Enzymaktivität eine 20 Bewertung der Transformationseffizienz oder des Expressionsortes oder -zeitpunktes gewährleisten. Ganz besonders bevorzugt sind dabei Reporter-Proteine (Schenborn E, Groskreutz D. Mol Biotechnol. 1999; 13(1):29-44) wie das "green fluorescence protein" (GFP) (Sheen et al. (1995) Plant Journal 25 8(5):777-784; Haseloff et al. (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94(6):2122-2127; Reichel et al. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93(12):5888-5893; Tian et al. (1997) Plant Cell Rep 16:267-271; WO 97/41228; Chui WL et al. (1996) Curr Biol 6:325-330; Leffel SM et al. (1997) Biotechniques. 30 23(5):912-8), die Chloramphenicoltransferase, eine Luziferase (Ow et al. (1986) Science 234:856-859; Millar et al. (1992) Plant Mol Biol Rep 10:324-414), das Aequorin (Prasher et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126(3):1259-1268), die β-Galactosidase, R-Locus Gen (kodieren ein Protein, das 35 die Produktion von Anthocyaninpigmenten (rote Färbung) in pflanzlichen Gewebe reguliert und so eine direkte Analyse der Promotoraktivität ohne Zugabe zusätzlicher Hilfsstoffe oder chromogener Substrate ermöglicht; Dellaporta et al., In: Chromosome Structure and Function: Impact of New Concepts, 40 18th Stadler Genetics Symposium, 11:263-282, 1988), ganz besonders bevorzugt ist die β-Glucuronidase (Jefferson et al., EMBO J. 1987, 6, 3901-3907).

c) Replikationsursprünge, die eine Vermehrung der erfindungsgemäßen Expressionskassetten oder Vektoren in zum Beispiel E.coli gewährleisten. Beispiellohaft seien genannt ORI (origin of DNA replication), der pBR322 ori oder der P15A ori 45

(Sambrook et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

5 d) Elemente, die für eine Agrobakterium vermittelte Pflanzentransformation erforderlich sind, wie zum Beispiel die rechte oder linke Begrenzung der T-DNA oder die vir-Region.

Die Einführung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette in 10 einen Organismus oder Zellen, Geweben, Organe, Teile bzw. Samen desselben (bevorzugt in Pflanzen bzw. pflanzliche Zellen, Gewebe, Organe, Teile oder Samen), kann vorteilhaft unter Verwendung von Vektoren realisiert werden, in denen die Expressionskassetten enthalten sind. Die Expressionskassette kann in den Vektor (zum 15 Beispiel ein Plasmid) über eine geeignete Restriktionsschnittstelle eingeführt werden. Das entstandene Plasmid wird zunächst in E.coli eingeführt. Korrekt transformierte E.coli werden selektioniert, gezüchtet und das rekombinante Plasmid mit dem Fachmann geläufigen Methoden gewonnen. Restriktionsanalyse 20 und Sequenzierung können dazu dienen, den Klonierungsschritt zu überprüfen.

Vektoren können beispielhaft Plasmide, Cosmide, Phagen, Viren oder auch Agrobacterien sein. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird die Einführung der Expressionskassette mittels Plasmidvektoren realisiert. Bevorzugt sind solche Vektoren, die eine stabile Integration der Expressionskassette in das Wirtsgenom ermöglichen.

30 Die Herstellung eines transformierten Organismus (bzw. einer transformierten Zelle oder Gewebes) erfordert, dass die entsprechende DNA, RNA oder Protein in die entsprechende Wirtszelle eingebracht wird.

35 Für diesen Vorgang, der als Transformation (oder Transduktion bzw. Transfektion) bezeichnet wird, steht eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung (Keown et al. (1990) Methods in Enzymology 185:527-537). So kann die DNA oder RNA beispielhaft direkt durch Mikroinjektion oder durch Bombardierung mit DNA-beschichteten 40 Mikropartikeln eingeführt werden. Auch kann die Zelle chemisch, zum Beispiel mit Polyethylenglycol, permeabilisiert werden, so dass die DNA durch Diffusion in die Zelle gelangen kann. Die DNA kann auch durch Protoplastenfusion mit anderen DNA-enthaltenden Einheiten wie Minicells, Zellen, Lysosomen oder Liposomen er- 45 folgen. Elektroporation ist eine weitere geeignete Methode zur Einführung von DNA, bei der die Zellen reversibel durch einen elektrischen Impuls permeabilisiert werden. Entsprechende Ver-

fahren sind beschrieben (beispielsweise bei Bilang et.al. (1991) Gene 100:247-250; Scheid et al. (1991) Mol Gen Genet 228:104-112; Guerche et al. (1987) Plant Science 52:111-116; Neuhause et al. (1987) Theor Appl Genet 75:30-36; Klein et al. (1987) Nature 327:70-73 ; Howell et al. (1980) Science 208:1265; Horsch et al.(1985) Science 227:1229-1231 ; DeBlock et al. (1989) Plant Physiology 91:694-701; Methods for Plant Molecular Biology (Weissbach and Weissbach, eds.) Academic Press Inc. (1988); and Methods in Plant Molecular Biology (Schuler and Zielinski, eds.) 10 Academic Press Inc. (1989)).

Bei Pflanzen werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation 15 genutzt. Geeignete Methoden sind vor allem die Protoplasten- transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone, die sogenannte "particle bombardment" Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung und 20 die Mikroinjektion.

Neben diesen "direkten" Transformationstechniken kann eine Transformation auch durch bakterielle Infektion mittels Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes durchgeführt werden. 25 Die Agrobacterium-vermittelte Transformation ist am besten für dicotyledone Pflanzenzellen geeignet. Die Verfahren sind beispielsweise beschrieben bei Horsch RB et al. (1985) Science 225: 1229f).

30 Werden Agrobakterien verwendet, so ist die Expressionskassette in spezielle Plasmide zu integrieren, entweder in einen Zwischenvektor (englisch: shuttle or intermediate vector) oder einen binären Vektor. Wird ein Ti oder Ri Plasmid zur Transformation verwendet werden soll, ist zumindest die rechte Begrenzung, 35 meistens jedoch die rechte und die linke Begrenzung der Ti oder Ri Plasmid T-DNA als flankierende Region mit der einzuführenden Expressionskassette verbunden.

Bevorzugt werden binäre Vektoren verwendet. Binäre Vektoren 40 können sowohl in E.coli als auch in Agrobacterium replizieren. Sie enthalten in der Regel ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter pflanzlicher Organismen (s.o.) und einen Linker oder Polylinker flankiert von der rechten und linken T-DNA Begrenzungssequenz. Sie können direkt in Agrobacterium 45 transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol Gen Genet 163:181-187). Außerhalb der T-DNA Region können Elemente wie ein Selektionsmarkergen zur Selektion transformierter Agro-

bakteria oder E.coli (z.B. nptIII) umfasst sein. Das in diesem Fall als Wirtsorganismus fungierende Agrobacterium sollte bereits ein Plasmid mit der vir-Region enthalten. Diese ist für die Übertragung der T-DNA auf die pflanzliche Zelle erforderlich. Ein so transformiertes Agrobacterium kann zur Transformation pflanzlicher Zellen verwendet werden. Die Verwendung von T-DNA zur Transformation pflanzlicher Zellen ist intensiv untersucht und beschrieben (EP 120 516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System, Offsetdrukkerij Kanters B.V., Albllasserdam, Chapter V; 10 An et al. (1985) EMBO J 4:277-287). Verschiedene binäre Vektoren sind bekannt und teilweise kommerziell erhältlich wie zum Beispiel pBI101.2 oder pBIN19 (Clontech Laboratories, Inc. USA).

Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind 15 beschrieben (Rogers et al. (1987) Meth in Enzymol 153:253-277; Schardl et al. (1987) Gene 61:1-11; Berger et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:8402-8406).

Direkte Transformationstechniken eignen sich für jeden Organismus 20 und Zelltyp eignen.

Im Falle von Injektion oder Elektroporation von DNA bzw. RNA in pflanzliche Zellen sind keine besonderen Anforderungen an das verwendete Plasmid gestellt. Einfache Plasmide wie die 25 der pUC-Reihe können verwendet werden. Sollen vollständige Pflanzen aus den transformierten Zellen regeneriert werden, so ist es erforderlich, dass sich auf dem Plasmid ein zusätzliches selektionierbares Marker gen befindet.

30 Stabil transformierte Zellen d.h. solche, die die eingeführte DNA integriert in die DNA der Wirtszelle enthalten, können von untransformierten selektioniert werden, wenn ein selektionierbarer Marker Bestandteil der eingeführten DNA ist. Als Marker kann beispielhaft jedes Gen fungieren, dass eine Resistenz 35 gegen ein Biozid (zum Beispiel ein Antibiotikum, Herbizid oder ein Metabolismusinhibitor wie 2-Desoxyglucose-6-phosphat WO 98/45456) verleiht (s.o.). Transformierte Zellen, die ein solches Markergen exprimieren, sind in der Lage, in der Gegenwart von Konzentrationen eines entsprechenden Antibiotikums oder 40 Herbicides zu überleben, die einen untransformierten Wildtyp abtöten. Beispiel sind oben genannt und umfassen bevorzugt das bar Gen, dass Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin verleiht (Rathore KS et al. (1993) Plant Mol Biol 21(5):871-884), das nptII Gen, dass Resistenz gegen Kanamycin verleiht, das hpt Gen, 45 das Resistenz gegen Hygromycin verleiht, oder das EPSP-Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat verleiht. Der Selektionsmarker erlaubt die Selektion von transformierten Zellen von

untransformierten (McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die erhaltenen Pflanzen können in üblicher Weise ge-
züchtet und gekreuzt werden. Zwei oder mehr Generationen sollten
kultiviert werden, um sicherzustellen, dass die genomische Inte-
gration stabil und vererblich ist.

Die oben genannten Verfahren sind beispielsweise beschrieben in
Jenes B et al. (1993) Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic
Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von
10 SD Kung und R Wu, Academic Press, S. 128-143 sowie in Potrykus
(1991) Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol 42:205-225). Vor-
zugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor
kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu trans-
formieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al. (1984) Nucl Acids
15 Res 12:8711f).

Sobald eine transformierte Pflanzenzelle hergestellt wurde, kann
eine vollständige Pflanze unter Verwendung von dem Fachmann be-
kannten Verfahren erhalten werden. Hierbei geht man beispielhaft
20 von Kalluskulturen aus. Aus diesen noch undifferenzierten Zell-
massen kann die Bildung von Spross und Wurzel in bekannter Weise
induziert werden. Die erhaltenen Sprösslinge können ausgepflanzt
und gezüchtet werden.

25 Dem Fachmann sind such Verfahren bekannt, um aus Pflanzenzellen,
Pflanzenteile und ganze Pflanzen zu regenerieren. Beispielsweise
werden hierzu Verfahren beschrieben von Fennell et al. (1992)
Plant Cell Rep. 11: 567-570; Stoeger et al (1995) Plant Cell
Rep. 14:273-278; Jahne et al. (1994) Theor Appl Genet 89:525-533
30 verwendet.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft mit weiteren Ver-
fahren die eine Pathogenresistenz (beispielsweise gegen Insekten,
Pilze, Bakterien, Nematoden etc.), Stressresistenz oder eine
35 andere Verbesserung der pflanzlichen Eigenschaften bewirken
kombiniert werden. Beispiele sind u.a. genannt bei Dunwell JM,
Transgenic approaches to crop improvement, J Exp Bot. 2000;51
Spec No; Seite 487-96.

40 "Transgen" meint bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäure-
sequenz, einer Expressionskassette oder einem Vektor enthaltend
besagte Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert
mit besagter Nukleinsäuresequenz, Expressionskassette oder
Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustandegekommene
45 Konstruktionen, in denen sich entweder

a) die NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz, oder
b) eine mit der NADPH-Oxidase Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein
5 Promotor, oder
c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden
10 oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitutionen, Additionen, Deletionen, Inversion oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen chromosomal Locus in dem Herkunftsorganismus
15 oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens
20 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des NADPH-Oxidase-Promotors mit dem entsprechenden NADPH-Oxidase-Gen - wird zu einer trans-
25 genen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beschrieben (US 5,565,350; WO 00/15815; siehe auch oben).

30 Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft transgene Organismen, transformiert mit wenigstens einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, Zellkulturen, Gewebe, Teile - wie zum Beispiel bei pflanzlichen Organismen Blätter, Wurzeln usw.-
35 oder Vermehrungsgut abgeleitet von solchen Organismen. Organismus ist breit zu verstehen und meint prokaryotische und eukaryotische Organismen, bevorzugt Bakterien, Hefen, Pilze, tierische und pflanzliche Organismen.

40 Bevorzugt sind

a) Pilze, wie Aspergillus, Eremothecium, Trichoderma, Ashbya, Neurospora, Fusarium, Beauveria oder weitere in Indian Chem Eng. Section B. Vol 37, No 1,2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6
45 beschriebene Pilze. Besonders bevorzugt ist der filamentöse Hemiascomycet Ashbya gossypii oder Eremothecium ashbyii.

b) Hefen wie *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*, besonders bevorzugt sind *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris* (ATCC Accession No. 201178),

5 c) Pflanzen gemäß der obengenannten Definition für "Pflanzen"

d) Vertebraten und Invertebraten. Besonders bevorzugte Vertebraten sind nicht-humane Säuger wie in Hund, Katze, Schaf, Ziege, Huhn, Maus, Ratte, Rind oder Pferd. Bevorzugte 10 tierische Zellen umfassen CHO, COS, HEK293 Zellen. Bevorzugte Invertebraten umfassen Insektenzellen wie *Drosophila S2* und *Spodoptera Sf9* oder *Sf21* Zellen,

e) prokaryontische Organismen wie gram-positive oder gram- 15 negative Bakterien wie *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cyanobacter*, *Escherichia* (vor allem *Escherichia coli*), *Serratia*, *Staphylococcus*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Penicillium* oder *Klebsiella* genannt.

20 Als transgene Organismen bevorzugte Wirts- oder Ausgangsorganismen sind vor allem Pflanzen gemäß der oben genannten Definition. Eingeschlossen sind im Rahmen der Erfindung alle Gattungen und Arten höherer und niedrigerer Pflanzen des 25 Pflanzenreiches. Eingeschlossen sind ferner die reifen Pflanzen, Saatgut, Sprossen und Keimlinge, sowie davon abgeleitete Teile, Vermehrungsgut und Kulturen, zum Beispiel Zellkulturen. Reife Pflanzen meint Pflanzen zu jedem beliebigen Entwicklungsstadium jenseits des Keimlings. Keimling meint eine junge, unreife 30 Pflanze in einem frühen Entwicklungsstadium. Insbesondere als Wirtsorganismen bevorzugte Pflanzen sind Pflanzen, auf die der erfindungsgemäße Verfahren zum Erzielen einer Pathogenresistenz gemäß oben genannten Kriterien angewendet werden kann. Ganz besonders bevorzugt sind monokotyle Pflanzen wie Weizen, 35 Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, als diktoyledone Kulturpflanzen wie Raps, Canola, Kresse, *Arabidopsis*, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, 40 Calendula, Melone, Kürbis oder Zucchini.

Die Herstellung der transgenen Organismen kann mit den oben beschriebenen Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Organismen realisiert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, transgenen Organismen und der von ihnen abgeleitete Zellen, Zellkulturen, Teile - wie zum Beispiel bei transgenen pflanzlichen Organismen Wurzeln, Blätter etc.-, und transgenes Vermehrungsgut wie Saaten oder Früchte, zur Herstellung von Nahrungs- oder Futtermitteln, Pharmazeutika oder Feinchemikalien.

Bevorzugt ist ferner ein Verfahren zur rekombinannten Herstellung von Pharmazeutika oder Feinchemikalien in Wirtsorganismen wobei ein Wirtsorganismus mit einer der oben beschriebenen Expressionskassetten transformiert wird und diese Expressionskassette ein oder mehrere Strukturgene enthält, die für die gewünschte Feinchemikalie kodieren oder die Biosynthese der gewünschten Feinchemikalie katalysieren, der transformierte Wirtsorganismus gezüchtet wird und die gewünschte Feinchemikalie aus dem Züchtungsmedium isoliert wird. Dieses Verfahren ist für Feinchemikalien wie Enzyme, Vitamine, Aminosäuren, Zucker, Fettsäuren, natürliche und synthetische Geschmacks-, Aroma- und Farbstoffe breit anwendbar. Besonders bevorzugt ist die Produktion von Tocopherolen und Tocotrienolen sowie Carotinoiden. Die Züchtung der transformierten Wirtsorganismen sowie die Isolierung aus den Wirtsorganismen bzw. aus dem Züchtungsmedium erfolgt mit dem Fachmann bekannten Verfahren. Die Produktion von Pharmazeutika, wie zum Beispiel Antikörpern oder Vakkinen ist beschrieben bei Hood EE, Jilka JM (1999) Curr Opin Biotechnol 10(4):382-6; Ma JK, Vine ND (1999) Curr Top Microbiol Immunol 236:275-92.

Sequenzen

30 1. SEQ ID NO: 1 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
2. SEQ ID NO: 2 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Gerste (*Hordeum vulgare*).
35 3. SEQ ID NO: 3 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis (*Oryza sativa* var. *japonica*)
40 4. SEQ ID NO: 4 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis (*Oryza sativa* var. *japonica*)
45 5. SEQ ID NO: 5 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Nicotiana tabacum*.

6. SEQ ID NO: 6 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Nicotiana tabacum

7. SEQ ID NO: 7 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Kartoffel
5 (Solanum tuberosum)

8. SEQ ID NO: 8 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Kartoffel
10 (Solanum tuberosum)

9. SEQ ID NO: 9 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Tomate
(Lycopersicon esculentum)

15 10. SEQ ID NO: 10 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase aus Tomate
(Lycopersicon esculentum)

20 11. SEQ ID NO: 11 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Arabidopsis thaliana (RbohF)

12. SEQ ID NO: 12 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase Arabidopsis
25 thaliana (RbohF)

13. SEQ ID NO: 13 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Arabidopsis thaliana (RbohD)

30 14. SEQ ID NO: 14 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase Arabidopsis
thaliana (RbohD)

15. SEQ ID NO: 15 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Nicotiana tabacum (rboh)
35

16. SEQ ID NO: 16 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Nicotiana tabacum (rboh)

40 17. SEQ ID NO: 17 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis
(Oryza sativa var. japonica)

18. SEQ ID NO: 18 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus Reis
45 (Oryza sativa var. japonica)

19. SEQ ID NO: 19 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohC)

20. SEQ ID NO: 20 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis thaliana* (RbohC)

5 21. SEQ ID NO: 21 Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus *Arabidopsis thaliana* (RbohA)

10 22. SEQ ID NO: 22 Aminosäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase aus NADPH-Oxidase *Arabidopsis thaliana* (RbohA)

15 23. SEQ ID NO: 23 Oligonukleotidprimer 5' NAOX
5'-GARCAAGGCTCTTGATTG-3'

24. SEQ ID NO: 24 Oligonukleotidprimer 3' Naox
5'-GAAATGCTCCTTATGGAATTC-3'

20

Abbildungen

25

Fig. 1: "RNA Interference" mit pNAox-dsRNA vermindert die Penetrationseffizienz des Echten Gerstenmehltau BghA6 in Gerste.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) wurde in fünf individuellen Experimenten bei Inokulation mit *Bgh* aus Gerste cv Pallas bestimmt. Die RPE errechnet sich als Differenz aus der 30 Penetrationseffizienz bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen und der Penetrationseffizienz bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

35

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

40

%-RPE = 100 * (RPE-1)

Die Säulen "1" bis "5" stellen die %-RPE (d.h. die Abweichung der Penetrationseffizienz vom Durchschnitt der Penetrationseffizienz der Kontrolle) bei Evaluierung von mindesten 100 Interaktionsstellen für jeweils ein unabhängiges Experiment dar. Die Säule 45 "m" stellt die durchschnittliche %-RPE der Experimente dar. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

"Control-dsRNA" stellt die parallelen Experimente mit einer Kontroll-dsRNA. "pNAox"-dsRNA stellt die Experimente mit der dsRNA der NADPH-Oxidase aus Gerste dar.

5 Die %-RPE war in Zellen, die mit pNAox-dsRNA beschossen wurden, deutlich (Signifikanz $p=0,0054$) vermindert im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-dsRNA (TR: humaner Thyroidrezeptor-dsRNA) bombardiert wurden.

10 Beispiele

Allgemeine Methoden:

Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, 15 in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeföhrten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarosegelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren 20 auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA werden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeföhr. 25 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgt mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma MWG-Licor nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74:5463-5467).

30 Beispiel 1: Pflanzen, Pathogene und Inokulation

Die Sorte Pallas wurde von Lisa Munk, Department of Plant Pathology, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Dänemark zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist beschrieben 35 (Kølster P et al. (1986) Crop Sci 26: 903-907).

Das 12 bis 36 h im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier vorgekeimte Saatgut wurde, wenn nicht anders beschrieben, zu je 5 Körnern an den Rand eines Vierkanttopfes (8x8 cm) in Frühstörfer Erde vom 40 Typ P ausgelegt, mit Erde bedeckt und regelmäßig mit Leitungswasser gegossen. Alle Pflanzen wurden in Klimaschränken oder -kammern bei 16 bis 18°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16-stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 3000 bzw. 5000 lux (50 bzw. 60 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ Photonenflussdichte) 5 bis 45 8 Tage lang kultiviert und im Keimlingsstadium in den Versuchen

verwendet. Bei Experimenten, in denen Applikationen an Primärblättern durchgeführt wurden, waren diese vollständig entwickelt.

Vor Durchführung der transienten Transfektionsexperimente

5 wurden die Pflanzen in Klimaschränken oder -kammern bei tagsüber 24°C, nachts 20°C, 50 bis 60 % relativer Luftfeuchte und einem 16stündigen Licht / 8stündigen Dunkelheitszyklus mit 30000 lux kultiviert.

10 Für die Inokulation von Gerstenpflanzen wurde Echte Gerstenmehltau *Blumeria graminis* (DC) Speer f.sp. *hordei* Em. Marchal der Rasse A6 (Wiberg A (1974) Hereditas 77: 89-148) (BghA6) verwendet. Dieser wurde vom Institut für Biometrie, JLU Gießen bereitgestellt. Die Nachzucht des Inokulums erfolgte in Klimakammern zu den gleichen Bedingungen, wie sie oben für die Pflanzen beschrieben sind, durch Übertragung der Konidien von befallenem Pflanzenmaterial auf regelmäßig angezogene, 7 Tage alte Gerstenpflanzen cv. Golden Promise bei einer Dichte von 100 Konidia/mm².

20 Die Inokulation mit BghA6 erfolgte unter Verwendung von 7 Tagen alten Keimlingen durch Abschütteln der Konidien bereits befallener Pflanzen in einem Inokulationsturm mit ca. 100 Konidien/mm² (soweit nicht anders angegeben).

25 Beispiel 2: Klonierung der pNAox cDNA Sequenz aus Gerste

Die zur Isolation der HvpNAox cDNA, ihrer Klonierung, Sequenzierung und Herstellung von Sonden benötigten cDNA 30 Fragmente wurden mittel RT-PCR unter Verwendung des "One Step RT-PCR Kit" (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland oder Qiagen, Hilden, Deutschland) erhalten. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Gerste-Sämlingen als Matrize verwendet. Die RNA wurde aus Pallas 3, 5 und 7 Tage nach Keimung isoliert. Darüberhinaus wurde RNA 35 aus Pallas und den rückgekreuzten Linien mit *mlo5*, *Mlg* oder *Mla12* 1, 2 und 5 Tage nach Inokulation mit BghA6 am 7 Tag nach Keimung isoliert. Für die RT-PCR wurden Primer verwendet, die von konservierten Regionen der gp91phox Homologen aus Reis und *Arabidopsis thaliana* abgeleitet sind (GenBank Acc.-No.: X93301 bzw.

40 AB008111):

5' NAOX: 5'-GARCAAGGCTTTGATTG-3' (SEQ ID NO: 23) und

3' Naox: 5' GAAATGCTCCTTATGGAATTC 3' (SEQ ID NO: 24)

Für die Reaktion (25 µL-Ansatz) wurden je 1000 ng Gesamt-RNA, 0,4 mM dNTPs, je 0,6 mM OPN-1 und OPN-2 Primer, 10 µl RNase-Inhibitor und 1 µl Enzymmix in 1x RT-Puffer (*one step RT-PCR Kit*, Qiagen, Hilden) eingesetzt.

5

Folgendes Temperaturprogramm wird verwendet (PTC-100TM Modell 96V; MJ Research, Inc., Watertown, Massachusetts):

1	Zyklus mit 30 min bei 50°C
10 1	Zyklus mit 150 sec bei 94°C
30	Zyklen mit 94°C für 45 sec, 55°C für 1 min und 72°C für 2 min
1	Zyklus mit 72°C für 7 min

15 Die PCR Produkt wurde mittels 2% w/v Agarosegelektrophorese aufgetrennt. Es wurde ein RT-PCR Produkt von 378 bp erhalten (SEQ ID NO: 1), das ein teil des offenen Leseraster der NADPH-Oxidase aus Gerste kodiert. Die entsprechende cDNA wurde aus einem Agarosegel isoliert und in den pGEM-T-Vektor (Promega, 20 Mannheim, Deutschland) mittels T-Überhang-Ligation kloniert. Die cDNAs wurden ausgehend von der Plasmid-DNA unter Verwendung des "Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing Kit" (Amersham, Freiburg, Deutschland) sequenziert. Das Konstrukt wurde mit pGEM-T-pNAox bezeichnet.

25

Beispiel 3: In vitro Synthese der pNAox dsRNA

Das Plasmid pGEM-T-pNAox, das für die in vitro RNA-Transkription eingesetzt wurde, beinhaltet den T7 und SP6 Promotor an den jeweiligen Enden der insertierten Nukleinsäuresequenz, was die Synthese von sense- bzw. antisense RNA ermöglicht. Das Plasmide kann mit geeigneten Restriktionsenzymen (ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase) linearisiert werden, um eine korrekte Transkription der insertierten Nukleinsäuresequenz zu gewährleisten und ein Durchlesen in vektorielle Sequenzen zu verhindern. Dazu wurden 10 µg pGEM-T-pNAox Plasmid-DNA jeweils mit ApaI für SP6- und PstI für T7-Polymerase geschnitten. Die geschnittenen Plasmide werden in 200 µl Wasser mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß (RNase frei) transferiert und 5 min bei 20000 g zentrifugiert. 180 µl der Plasmid-Lösung wurden mit 420 µl Ethanol versetzt, auf Eis gestellt und anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 20000 g und - 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 10 µl TE Puffer aufgenommen. 45 Die jeweiligen Präparationen wurden direkt in eine in vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase bzw. SP6-RNA-Polymerase

eingesetzt. RNA Polymerasen wurden von Roche Molecular Biology, Mannheim, Deutschland bezogen.

Jeder Transkriptionsansatz beinhaltete in einem Volumen of 40 µl:

5 2 µl linearisierte Plasmid DNA (1 µg)
 2 µl NTP's (25 mM) (1,25 mM von jedem NTP)
 4 µl 10xReaktionspuffer (Roche Molecular Biology),
 1 µl RNAsin RNAsin (27 Units; Roche Molecular Biology),
10 2 µl RNA Polymerase (40 Units)
 29 µl DEPC-Wasser

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C wurde jeweils ein Teil der Reaktionsansätze aus der Transkription des "sense"- bzw. "anti-sense"-Stranges gemischt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend durch Abkühlung über 30 min auf eine Endtemperatur von 37°C miteinander hybridisiert ("annealing"). Alternativ kann nach der Denaturierung das Gemisch aus sense- und antisense-Strang auch für 30 min bei -20°C gekühlt werden. Das Protein-präzipitat, das sich während Denaturierung und Hybridisierung bildet wurde durch kurze Zentrifugation bei 20800 g abgetrennt und der Überstand direkt zur Beschichtung von Wolframpartikeln verwendet (s. unten). Zur Analyse wurden jeweils 1 µl jeden RNA-Stranges und der dsRNA auf einem nicht-denaturierenden Agarosegel 25 aufgetrennt. Eine erfolgreiche Hybridisierung zeigte sich, durch eine Bandenverschiebung zu höherem Molekulargewicht im Vergleich zu den Einzelsträngen.

4 µl der dsRNA wurden Ethanol-präzipitiert (durch Zugabe von 6 µl 30 Wasser, 1 µl 3M Natriumacetat-Lösung und 25 µl Ethanol, sowie Zentrifugation für mindestens 5 min bei 20000 g und 4°C) und in 500 µl Wasser resuspendiert. Das Absorbtionsspektrum zwischen 230 und 300 nm wurde gemessen, bzw. die Absorption bei 280 und 260 nm bestimmt, um die Reinheit und die Konzentration der dsRNA 35 zu bestimmen. In der Regel wurden 80 bis 100 µg dsRNA mit einem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis von 1,80 bis 1,95 erhalten. Ein Verdau mit DNase I kann optional durchgeführt werden, beeinflusst jedoch nachfolgende Ergebnisse nicht wesentlich.

40 Als Kontroll-dsRNA fungierte die dsRNA des humanen Thyroïdrezeptors (Ausgangsvektor pT7betaSal (Norman C et al. (1988) Cell 55(6):989-1003) zur Verfügung gestellt von Dr. Baniahmad, Institut für Genetik, Gießen, Deutschland; die Sequenz des Insert ist beschrieben unter der GenBank Acc.-No.: NM_000461). Für die 45 Herstellung der sense-RNA wurde das Plasmid mit PvuII, für die antisense-RNA mit HindIII verdaut und die RNA dann mit T7- bzw. SP6 RNA-Polymerase transkribiert. Die einzelnen Verfahrens-

schritte zur Herstellung der Kontroll-dsRNA werden analog den oben für die pNAox-dsRNA beschriebenen durchgeführt.

Beispiel 4: Transiente Transformation, RNAi und Evaluation
5 der Pilzpathogenentwicklung

Gerste cv Pallas Blattsegmente wurden mit einer pNAox-dsRNA zusammen mit einem GFP-Expressionsvektor transformiert.

Anschließend wurden die Blätter mit Bgh inokuliert und das

10 Ergebnis nach 48 h mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Penetration in GFP-exprimierenden Zellen wurde mittels Detektion von Haustorien in lebenden Zellen und durch Bewertung der Pilzentwicklung in eben diesen Zellen beurteilt. In allen fünf Experimenten führte die Bombardierung von Gerste cv 15 Pallas mit pNAox-dsRNA zu einer verminderten Anzahl von erfolgreich durch Bgh penetrierten Zellen im Vergleich zu Zellen die mit einer fremden Kontroll-dsRNA (humaner Thyroidhormonrezeptor dsRNA, TR) bombardiert wurden. Der resistenzinduzierende Effekt der pNAox-dsRNA bedingte eine durchschnittliche Verminderung der 20 Penetrationseffizienz durch Bgh um 35 % (Fig. 4).

Es wurde ein Verfahren zur transienten Transformation eingesetzt das bereits für die biolistische Einführung von dsRNA in epidermale Zellen von Gerstenblättern beschrieben wurde (Schweizer

25 P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; Schweizer P et al. (2000) Plant J 2000 24: 895-903). Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 1,1 µm (Partikeldichte 25 mg/ml) wurden mit dsRNA (Herstellung siehe oben) zusammen mit Plasmid-DNA des Vektors pGFP (GFP unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors) 30 als Transformationsmarker beschichtet. Dazu wurden pro Schuss die nachfolgender Mengen an dsRNA bzw. Reporterplasmid zur Beschichtung verwendet: 1 µg pGFP und 2 µg dsRNA. Doppelsträngige RNA wurde mittels Verschmelzens von "sense" und "antisense"-RNA in vitro synthetisiert (s.o.).

35

Für Microcarrier-Präparation wurden 55 mg Wolframpartikel (M 17, Durchmesser 1,1 µm; Bio-Rad, München) zweimal mit 1 ml autoklaviertem Destilliertem Wasser und einmal mit 1 mL absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1 ml 50 %igem Glycerin aufgenommen (ca. 50 mg/ml Stammlösung). Die Lösung wurde mit 50 %igem Glycerin auf 25 mg/ml verdünnt, vor Gebrauch gut gemischt und im Ultraschallbad suspendiert. Zur Microcarrier-Beschichtung wurden pro Schuss 1 µg Plasmid, 2 µg dsRNA (1 µL), 12,5 µl Wolframpartikel-Suspension (25 mg/ml), 12,5 µl 1 M Ca(NO₃)₂-Lösung 40 45 (pH 10) tropfenweise unter ständigem Mischen zusammengegeben, 10 min bei RT stehengelassen, kurz zentrifugiert und 20 µl vom

Überstand abgenommen. Der Rest mit den Wolframpartikel wird resuspendiert (Ultraschallbad) und ins Experiment eingesetzt.

Es wurden ca. 4 cm lange Segmente von Gerstenprimärblättern verwendet. Die Gewebe wurden auf 0,5 % Phytagar (GibcoBRL™ Life Technologies™, Karlsruhe) mit 20 µg/ml Benzimidazol in Petrischalen (6,5 cm Durchmesser) gelegt und direkt vor dem Partikelbeschuss an den Rändern mit einer Schablone mit einer recht-eckigen Aussparung von 2,2 cm x 2,3 cm abgedeckt. Die Schalen wurden nacheinander auf den Boden der Vakuumkammer (Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54) gestellt, über dem ein Nylonnetz (Maschenweite 0,2 mm, Millipore, Eschborn) als Diffusor auf einer Lochplatte eingeschoben war (5 cm über dem Boden, 11 cm unterhalb des Macrocarriers, s.u.), um Partikelklumpen zu zerstreuen und den Partikelstrom abzubremsen. Der oben an der Kammer angebrachte Macrocarrier (Plastik-Sterilfilterhalter, 13 mm, Gelman Sciences, Swinney, UK) wurde je Schuss mit 5,8 µL DNA-beschichteten Wolframpartikeln (Microcarrier, s.u.) beladen. Mit einer Membranvakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim) wurde der Druck um 0,9 bar in der Kammer reduziert und die Wolframpartikel mit 9 bar Heliumgasdruck auf die Oberfläche des Pflanzengewebes geschossen. Sofort danach wurde die Kammer belüftet. Zur Markierung transformierter Zellen wurden die Blätter mit dem Plasmid (pGFP; Vektor auf pUC18-Basis, CaMV 35S-Promoter/Terminator-Kassette mit insertiertem GFP-Gen; Schweizer P et al. (1999) Mol Plant Microbe Interact 12:647-54; zur Verfügung gestellt von Dr. P. Schweizer Schweizer P, Institut für Pflanzengenetik IPK, Gatersleben, Deutschland) beschossen. Vor dem Schießen eines anderen Plasmids wurde der Macrocarrier jeweils gründlich mit Wasser gereinigt. Nach vierstündiger Inkubation nach dem Beschuss bei leicht geöffneten Petrischalen, RT und Tageslicht wurden die Blätter mit 100 Konidien/mm² des Echten Gerstenmehltaupilzes (Rasse A6) inkokuliert und für weitere 40 bis 48 h unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Blattsegmente wurden mit den beschichteten Partikeln unter Verwendung einer "particle inflow gun" bombardiert. Pro Schuss wurden 312 µg Wolframpartikel appliziert. 4 h nach der Bombardierung wurde Inokulation mit *Blumeria graminis f.sp. hordei* Mehltau (Rasse A6) inkokuliert und nach weiteren 40 h bezüglich der Infektionsanzeichen ausgewertet. Das Ergebnis (z.B. die Penetrationseffizienz, definiert als prozentualer Anteil angegriffener Zellen, die ein reifes Haustorium und eine Sekundärhyphae ("secondary elongating hyphae") wurde mittels Fluoreszens- und Lichtmikroskopie analysiert. Eine Inokulation mit 100 Conidia/mm² ergibt eine Angriffs frequenz von ca. 50 % der transformierten Zellen. Für jedes einzelne Experiment wurde eine

minimale Anzahl von 100 Interaktionsstellen ausgewertet. Transformierte (GFP exprimierende) Zellen wurden unter Anregung mit blauem Licht identifiziert. Drei verschiedene Kategorien von transformierten Zellen konnten unterschieden werden:

5

1. Penetrierte Zellen, die ein leicht erkennbares Haustorium beinhalten. Eine Zelle mit mehr als einem Haustorium wurde als eine Zelle gewertet.

10 2. Zellen, die durch ein Pilz-Appressorium zwar angegriffen wurden, aber kein Haustorium beinhalten. Eine Zelle die mehrfach von Bgh angegriffen wurden, aber kein Haustorium enthält, wurde als eine Zelle gewertet.

15 3. Zellen die nicht durch Bgh angegriffen sind.

Stomatazellen und Stomatanebenzellen wurden von der Bewertung ausgeschlossen. Oberflächenstrukturen von Bgh wurden mittels Lichtmikroskopie oder Fluoreszenzfärbung des Pilzes mit 0,1 %

20 Calcofluor (w/v in Wasser) für 30 sec analysiert. Die Entwicklung des Pilzes kann leicht durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Calcofluor evaluiert werden. In pNAox-dsRNA transformierten Zellen entwickelt der Pilz zwar ein primäres und ein appressoriales Keimschlauch ("Germ-Tube") aber kein
25 Haustorium. Haustoriumausbildung ist eine Vorbedingung für die Bildung einer Sekundärhyphae.

Die relative Penetrationseffizienz (RPE) errechnet sich als Differenz aus der Penetrationseffizienz bei transformierten

30 Zellen (Transformation mit pNAox- oder Kontroll-dsRNA) und der Penetrationseffizienz bei untransformierten Zellen (hier: durchschnittliche Penetrationseffizienz 38,74 %). Die prozentuale RPE (%-RPE) errechnet sich aus der RPE minus 1 und multipliziert mit 100.

35

$$\text{RPE} = \frac{[\text{PE bei pNAox-dsRNA transformierten Zellen}]}{[\text{PE bei Kontroll-dsRNA transformierten Zellen}]}$$

$$\%-\text{RPE} = 100 * (\text{RPE}-1)$$

40

Der %-RPE-Wert (Abweichung von der durchschnittlichen Penetrationseffizienz der Kontrolle) dient der Bestimmung der Suszeptibilität von Zellen, die mit pNAox-dsRNA transfiziert sind (Fig. 4).

45

Bei der Kontroll-dsRNA wurde bei fünf unabhängigen Versuchen kein Unterschied zwischen der Transfektion mit der Kontroll dsRNA und Wasser bezüglich der Penetrationseffizienz von *Bgh* beobachtet.

5 Um einen Einfluss auf der dsRNA auf die Transformationsrate oder Überlebensrate der angegriffenen Zellen auszuschließen, wurde die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen zwischen Kontroll- und pNAox-dsRNA Experimenten verglichen. Die pNAox-dsRNA hatten keinen Einfluss auf die Gesamtanzahl- oder die Anzahl der ange-
10 griffenen GFP-exprimierenden Zellen.

Beispiel 5: Inhibition der NADPH-Oxidase mit Diphenyleniodonium-chlorid

15 Untermauert werden die Ergebnisse durch weitere Experimente mit dem NADPH-Oxidase Inhibitor Diphenyleniodoniumchlorid (DPI; Tabelle 1). Im allgemeinen wurden die Experimente durchgeführt wie von Hückelhoven und Kogel, 1998.

20 Tab. 1: Wirkung von DPI auf die Pathogenabwehr in Pallas^a

Art der Interaktion	Interaktionen (% ± Standardfehler)	
	Kontrolle ^b	200 µM DPI ^c
Penetration	68.25 ± 9.9	16.25 ± 0.5
Nicht-Penetration	24.25 ± 6.3	67.5 ± 9.5
HR (Hypersensitive Reaktion)	7.5 ± 3.7	16.25 ± 9.3

30 a DPI-Behandlung erfolgte 12 h nach Pathogen-Inokkulation, die Auswertung 36 h nach Inokkulation.

b Kontrolle mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, mit DMSO Gehalt wie bei DPI Behandlung.

c DPI gelöst in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8, ausgehend von einer 10 mg/ml DPI Stammlösung in DMSO.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Erzielen oder Erhöhen der Resistenz gegen mindestens ein Pathogen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet,
5 dass nachfolgende Arbeitsschritte umfasst sind
 - a) Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase in einer Pflanze oder einem Gewebe, Organ, Teil oder Zelle derselben und
10
 - b) Auswahl der Pflanzen, bei denen - im Unterschied oder Vergleich zur Ausgangspflanze - die Resistenz gegen mindestens ein Pathogen besteht oder erhöht ist.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die NADPH-Oxidase kodiert wird durch
 - a) Polypeptidsequenzen umfassend eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22,
20 oder
 - b) Polypeptidsequenzen eines funktionellen Äquivalentes eines Polypeptides, welches eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22
25 umfasst.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das funktionelle Äquivalent eine Homologie von mindestens 50 % zu einem der Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 oder 22 hat.
- 35 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase gewährleistet wird durch Anwendung eines Verfahrens ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Einbringen einer doppelsträngigen NADPH-Oxidase Ribonukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten,
40
 - b) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,

- c) Einbringen einer NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 5 d) Einbringen von NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 10 e) Einbringen DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 15 f) Einbringen von den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukten oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette,
- 20 g) Einbringen von Konstrukten zur Induktion einer homologen Rekombination an endogenen NADPH-Oxidase-Genen und
- h) Einführung von Mutationen in ein endogenes NADPH-Oxidase Gen.

5.. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, umfassend

- 25 (i) die stabile Transformation einer pflanzlichen Zelle mit einer rekombinanten Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in Pflanzen aktiven Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für
 - a) eine doppelsträngigen NADPH-Oxidase RNA-Ribonukleinsäuresequenz oder
 - b) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz oder
 - 30 c) eine NADPH-Oxidase antisense-Nukleinsäuresequenz kombiniert mit einem Ribozym oder
 - d) eine NADPH-Oxidase sense-Nukleinsäuresequenzen zur Induktion einer Kosuppression oder
 - 35 e) DNA-oder Protein-bindende Faktoren gegen NADPH-Oxidase-Gene, -RNAs oder -Proteine
 - f) den NADPH-Oxidase RNA-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen

40

45

(ii) Regeneration der Pflanze aus der pflanzlichen Zelle, und

(iii) Expression besagter Nukleinsäuresequenz in einer Menge und für eine Zeit hinreichend, um eine Pathogenresistenz 5 in besagter Pflanze zu erzeugen oder zu erhöhen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Pathogen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Pilzen, Insekten, Viren und Nematoden.

10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Pathogen ausgewählt ist aus der Gruppe der Pilze bestehend aus Plasmodiophoromycota, Oomycota, Ascomycota, Chytridiomyceten, Zygomyceten, Basidiomycota und Deuteromyceten.

15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze aus den monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen ausgewählt ist.

20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe der monokotyledonen Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen oder Zuckerrohr.

25 10. Doppelsträngiges RNA-Molekül zur Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase umfassend

a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase, und

b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen komplementären ist.

30 11. Doppelsträngiges RNA-Moleköl nach Anspruch 10, wobei die beiden RNA-Stränge der doppelsträngigen RNA kovalent miteinander verbunden sind.

35 12. Doppelsträngiges RNA-Moleköl nach einem der Ansprüche 10 oder 11, wobei einer der beiden RNA-Stränge kodiert wird durch zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent derselben.

40

45

13. Transgene Expressionskassette enthaltend in funktioneller Verknüpfung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor eine Nukleinsäuresequenz kodierend für ein doppelsträngiges RNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12.
14. Transgene Expressionskassette enthaltend zumindest einen Teil einer Nukleinsäuresequenz kodierend für eine NADPH-Oxidase gemäß SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 oder 21 oder ein funktionelles Äquivalent derselben, wobei besagte Nukleinsäuresequenz in antisense-Orientierung mit einem in pflanzlichen Organismen funktionellen Promotor funktionell verknüpft ist.
- 15 15. Transgene Expressionskassette nach Anspruch 13 oder 14, wobei der in Pflanzen funktionelle Promotor ein pathogen-induzierbarer Promotor ist.
16. Transgener Vektor enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15.
17. Transgener Organismus enthaltend ein doppelsträngiges RNA-Moleköl gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12, eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15 oder einen Vektor gemäß Anspruch 16.
18. Transgener Organismus nach Anspruch 17 ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Bakterien, Hefen, Tieren und Pflanzen.
- 30 19. Transgener Organismus nach Anspruch 17 oder 18, ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzen bestehend aus Weizen, Hafer, Hirse, Gerste, Roggen, Mais, Reis, Buchweizen, Sorghum, Triticale, Dinkel, Leinsamen, Zuckerrohr, Raps, Canola, Kresse, Arabidopsis, Kohlarten, Soja, Alfalfa, Erbse, Bohnengewächsen, Erdnuss, Kartoffel, Tabak, Tomate, Aubergine, Paprika, Sonnenblume, Tagetes, Salat, Calendula, Melone, Kürbis und Zucchini.
- 40 20. Gewebe, Organ, Teil, Zelle, Zellkultur oder Vermehrungsgut abgeleitet von einem transgenen Organismus gemäß einem der Ansprüche 18 oder 19.

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 0000053765	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP2003/007589	International filing date (day/month/year) 14 July 2003 (14.07.2003)	Priority date (day/month/year) 22 July 2002 (22.07.2002)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82, 15/24, A01H 5/10		
Applicant	BASF PLANT SCIENCE GMBH	

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2004 (23.01.2004)	Date of completion of this report 15 October 2004 (15.10.2004)
Name and mailing address of the IPEA/EP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP2003/007589

I. Basis of the report**1. With regard to the elements of the international application:*** the international application as originally filed the description:pages _____ 1-71 _____, as originally filed
pages _____ _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the claims:pages _____ 1-20 _____, as originally filed
pages _____ _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____ _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the drawings:pages _____ 1/1 _____, as originally filed
pages _____ _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____ the sequence listing part of the description:pages _____ _____, as originally filed
pages _____ _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____**2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.**
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).**3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:** contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.**4. The amendments have resulted in the cancellation of:** the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig. _____**5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).****

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/... 03/07589

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present application relates to a method for increasing pathogenic resistance in plants by reducing the protein content, activity or function of an NADPH oxidase.

The increased resistance of barley plants to natural barley mildew is shown as an example.

2. A method that would correspond to the claimed method is not disclosed in the cited prior art. On the basis of the cited literature, a person skilled in the art would expect increased resistance to be achievable by increasing the NADPH oxidase. The subject matter of claims 1-10 can therefore be considered to be novel and to involve an inventive step.

3. A person skilled in the art would also not have been motivated to produce the double-strand RNA molecules claimed in claims 11-20 by reducing the expression of an NADPH oxidase.

4. On the other hand, it is not clear whether the claimed invention can be performed throughout its entire scope. Only one example in which a specific combination of host plant and pathogen exhibits increased resistance is shown in the application. It

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/AU 03/07589

cannot be inferred from that example that a reduction in the NADPH oxidase results in increased pathogenic resistance in every case. Since the present application contradicts the general teaching, one embodiment does not appear sufficient to refute this teaching.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESEN

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT (Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Annehmers oder Anwalts 0000053765	WEITERES VORGEHEN	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA416)
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07589	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 14.07.2003	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22.07.2002
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Annehmer BASF PLANT SCIENCE GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Annehmer gemäß Artikel 36 übermittelt.

2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:
 - I Grundlage des Bescheids
 - II Priorität
 - III Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
 - IV Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
 - V Begründete Feststellung nach Regel 66.2 a)ii) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
 - VI Bestimmte angeführte Unterlagen
 - VII Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
 - VIII Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23.01.2004	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 15.10.2004
Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Bilang, J Tel. +49 89 2399-8707



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07589

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):

Beschreibung, Seiten

1-71 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Ansprüche, Nr.

1-20 in der ursprünglich eingereichten Fassung

Zeichnungen, Blätter

1/1 in der ursprünglich eingereichten Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um:

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 03/07589

5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen.)

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung	
Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-20
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (IS)	Ja: Ansprüche 1-20
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (IA)	Ja: Ansprüche: 1-20
	Nein: Ansprüche:

2. Unterlagen und Erklärungen:

siehe Beiblatt

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Pathogenresistenz bei Pflanzen durch Verminderung der Proteinmenge, Aktivität oder Funktion einer NADPH-Oxidase.
Als Beispiel wird die erhöhte Resistenz von Gerstenpflanzen auf den echten Gerstenmehltau gezeigt.
2. Im zitierten Stand der Technik wird kein Verfahren, welches dem beanspruchten Verfahren entsprechen würde, offenbart. Aufgrund der zitierten Literatur würde der Fachmann erwarten, dass eine erhöhte Resistenz durch Erhöhung der NADPH-Oxidase erzielt werden könnte. Der Gegenstand der Ansprüche 1-10 kann daher als neu und auf einer erfinderischen Tätigkeit beruhend angesehen werden.
3. Der Fachmann hätte auch keine Motivation, die in den Ansprüchen 11-20 beanspruchten Doppelsträngigen RNA-Moleküle zur Verminderung der Expression einer NADPH-Oxidase herzustellen.
4. Andererseits ist es nicht klar, ob die beanspruchte Erfindung in ihrer ganzen Breite hergestellt werden kann. In der Anmeldung wird lediglich ein Beispiel gezeigt, in der eine bestimmte Kombination von Wirtspflanze und Pathogen eine erhöhte Resistenz zeigt. Daraus kann nicht abgeleitet werden, dass eine Verringerung der NADPH-Oxidase in jedem Fall zu einer erhöhten Pathogenresistenz führt. Da die vorliegende Anmeldung der allgemeinen Lehrmeinung widerspricht, scheint ein Ausführungsbeispiel nicht ausreichend, um diese Lehrmeinung zu widerlegen.